

**ZYTOGENETISCHE CHARAKTERISIERUNG UND IN-SILICO-TRANSLATION
ZWEIER MURINER DARMTUMORZELLINIEN**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Hans Rhode

geboren am 12.08.1992 in Jena

Gutachter:

1. PD Dr. Thomas Liehr, Jena
2. apl. Prof. Dr. Ferdinand von Eggeling, Jena
3. PD Mag. Dr. Irmgard Verdorfer, Innsbruck

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.07.2018

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 6 |
| 1 Zusammenfassung..... | 8 |
| 2 Einleitung..... | 9 |
| 2.1 Kolorektales Karzinom | 9 |
| 2.1.1 Überblick | 9 |
| 2.1.2 Tumorgenetik..... | 9 |
| 2.1.3 Tumorzytogenetik..... | 10 |
| 2.2 Murine Zelllinien als Modell für humane solide Tumoren | 11 |
| 2.2.1 Eigenschaften des Mausgenoms, Vergleich zum Humangenom..... | 11 |
| 2.2.2 Entwicklung und Anwendung muriner Zelllinien..... | 12 |
| 2.2.3 CMT-93 und CT26.WT als Modell für das KKR | 13 |
| 2.3 Methodische Grundlagen | 15 |
| 2.3.1 Klassische Zytogenetik | 15 |
| 2.3.2 Molekulare Zytogenetik..... | 15 |
| 2.3.2.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung | 15 |
| 2.3.2.2 Multicolor-FISH..... | 16 |
| 2.3.2.3 Murines Multicolor Banding | 17 |
| 2.3.3 Array-based Comparative Genomic Hybridization | 17 |
| 2.3.4 In-silico-Translation..... | 18 |
| 2.4 Ziele der Arbeit | 19 |
| 3 Material und Methoden | 20 |
| 3.1 Zellkultur..... | 20 |
| 3.2 Präparation der Chromosomen..... | 20 |
| 3.3 Auftropfen der Zellsuspension auf den Objektträger | 21 |
| 3.4 mFISH..... | 21 |
| 3.4.1 Postfixation | 22 |

| | |
|---|----|
| 3.4.2 Denaturierung des Objektträger-Materials | 23 |
| 3.4.3 Denaturierung der Sonde | 23 |
| 3.4.4 Hybridisierung..... | 23 |
| 3.4.5 Posthybridisierungsschritte (Waschen und Detektion) | 23 |
| 3.4.6 Fluoreszenz-Mikroskopie und Datenanalyse | 24 |
| 3.5 mcb | 25 |
| 3.5.1 Postfixation | 25 |
| 3.5.2 Denaturierung des Objektträger-Materials | 25 |
| 3.5.3 Denaturierung der Probe | 25 |
| 3.5.4 Hybridisierung..... | 26 |
| 3.5.5 Posthybridisierungsschritte (Waschen und Detektion) | 26 |
| 3.5.6 Fluoreszenz-Mikroskopie und Datenanalyse | 27 |
| 3.6 array-CGH | 27 |
| 3.7 In-silico-Translation | 27 |
| 4 Ergebnisse | 28 |
| 4.1 CMT-93 | 28 |
| 4.1.1 Molekulare Zytogenetik..... | 28 |
| 4.1.1.1 mFISH | 28 |
| 4.1.1.2 mcb..... | 30 |
| 4.1.2 array-CGH und in-silico-Translation..... | 37 |
| 4.1.3 Zusammengesetzter Karyotyp | 42 |
| 4.2 CT26.WT..... | 42 |
| 4.2.1 Molekulare Zytogenetik..... | 42 |
| 4.2.1.1 mFISH | 42 |
| 4.2.1.2 mcb..... | 45 |
| 4.2.2 array-CGH und in-silico-Translation..... | 54 |
| 4.2.3 Zusammengesetzter Karyotyp | 59 |

| | |
|--|----|
| 5 Diskussion | 60 |
| 5.1 Methodenkritik | 60 |
| 5.1.1 mFISH | 60 |
| 5.1.2 mcb..... | 61 |
| 5.1.3 array-CGH..... | 63 |
| 5.1.4 Sequenzierung (Literaturvergleich für CT26.WT) | 63 |
| 5.2 Zytogenetische Charakterisierung..... | 64 |
| 5.2.1 Chromosomensatz | 64 |
| 5.2.2 Klonale Einteilung | 64 |
| 5.2.3 Nichtklonale Veränderungen | 65 |
| 5.2.3.1 Numerische Aberrationen..... | 65 |
| 5.2.3.2 Strukturelle Aberrationen | 65 |
| 5.2.4 Imbalancen und Bruchpunkte..... | 66 |
| 5.2.5 Polyploidisierung..... | 67 |
| 5.2.6 Chromothripsis..... | 67 |
| 5.2.7 Isodizentrische Chromosomen | 68 |
| 5.2.8 Neozentromere..... | 68 |
| 5.2.9 Markerchromosomen | 68 |
| 5.3 In-silico-Translation | 69 |
| 5.3.1 Literaturvergleich der Bruchpunkte..... | 69 |
| 5.3.2 Literaturvergleich der Imbalancen..... | 70 |
| 6 Ausblick..... | 73 |
| 7 Literaturverzeichnis..... | 74 |
| Anhang | 79 |

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen des International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN 2016):

| | | | |
|------|--------------------|------|---|
| amp | Amplifikation | idic | isodizentrisches Chromosom |
| cen | Zentromer | mar | Markerchromosom |
| cp | Komposit-Karyotyp | neo | Neozentromer |
| del | Deletion | qter | terminale Bande eines (Maus)Chromosoms |
| der | Derivativchromosom | t | Translokation |
| dup | Duplikation | r | Ringchromosom |
| idem | derselbe Karyotyp | | |

Maßeinheiten:

| | | | |
|----|--------------|-----|------------------------|
| °C | Grad Celsius | µg | Mikrogramm |
| g | Gramm | µl | Mikroliter |
| mg | Milligramm | rpm | Umdrehungen pro Minute |
| ml | Milliliter | | |

array-CGH array-based Comparative Genomic Hybridization

BAC-FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Bacterial Artificial Chromosomes

CCD charge-coupled device

CO₂ Kohlenstoffdioxid

CMT-93 eine der untersuchten murinen Tumorzelllinien

CT26.WT Colon Tumor 26 Klon WT, eine der untersuchten murinen Tumorzelllinien

Cy-3 Cyanin 3

Cy-5 Cyanin 5

d.F. der Fälle

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindol

DNA Desoxyribonukleinsäure

dUTP 2'-Deoxyuridin-5'-Triphosphat

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

F(ab')₂ Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers

FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FITC Fluoresceinisothiocyanat

G-Bänderung Giemsa-Bänderung

IgG (H+L) Immunglobulin G mit leichter und schwerer Kette

ISCN International System for Human Cytogenomic Nomenclature

KRK Kolorektales Karzinom des Menschen

MCB Multicolor-Banding beim Menschen

mcb murines Multicolor-Banding

mFISH Multicolor-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

M-FISH Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung bestehend aus Natriumchlorid,
Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat

PCR Polymerase-Kettenreaktion

RT Position im Karyogramm für die Markerchromosomen

SA-Cy5 Streptavidin-Cyanin 5

SKY Spektrale Karyotypisierung

SSC Puffer aus tri-Natriumcitrat 88,23 g/L (0,3 M) und Natriumchlorid 175,32 g/L
(3 M)

1 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung und die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache bei Erwachsenen. In der zielgerichteten Therapie wie auch der Prognoseeinschätzung gewinnen neuere molekulargenetische Daten eine zunehmend größere Bedeutung. Murine Tumorzelllinien sind als Modellsystem für das KRK etabliert, aber ihre zytogenetischen Eigenschaften waren bislang noch unzureichend erfasst. Die vorliegende Arbeit hatte daher das Ziel, zwei der am häufigsten verwendeten murinen Darmtumorzelllinien, CMT-93 und CT26.WT, erstmals durch molekular-zytogenetische Methoden (Multicolor-FISH (mFISH), murines Multicolor Banding (mcb) und array-based Comparative Genomic Hybridization (array-CGH)) zu charakterisieren. Die ermittelten chromosomalen Imbalancen und Bruchpunkte sollten durch in-silico-Translation in das Humangenom mit denen des KRK verglichen werden, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu überprüfen und eine Zuordnung des Tumorstadiums vorzunehmen.

CMT-93 und CT26.WT zeigten einen hyperdiploiden bzw. hypertriploiden Chromosomensatz. Während für CMT-93 klonale Aberrationen ausschließlich der Chromosomen 2, 5, 8 und X beobachtet wurden, zeigte sich für CT26.WT eine größere Variabilität hinsichtlich der beteiligten Chromosomen und Kopiezahlen. Beide Zelllinien neigten zur Bildung von isodizentrischen Chromosomen und Neozentromeren und es konnten 17 bzw. 28 tumorassoziierte Bruchpunkte für CMT-93 und CT26.WT ermittelt werden. Bei den gefundenen Imbalancen handelte es sich fast ausschließlich um Zugewinne. Nur bei den Gonosomen zeigte sich ein Verlust des Y-Chromosoms in CMT-93 sowie eine klonale Deletion des X-Chromosoms bei CT26.WT. Weiterhin lag in CMT-93 in etwa 1 Prozent der Metaphasen Chromothripsis vor.

Ein Literaturvergleich ergab hinsichtlich der ermittelten Imbalancen eine hohe Übereinstimmung beider Zelllinien mit den häufigsten Amplifikationen des metastasierten KRK. CMT-93 und CT26.WT erscheinen somit geeignet als Modellsystem für fortgeschrittene Tumorstadien.

Zukünftige Arbeiten sollten sich mit der Analyse kleinerer Imbalancen sowie mit der genaueren Untersuchung nichtklonaler Aberrationen befassen. Auch sollten weitere murine Tumorzelllinien molekular-zytogenetisch untersucht und auf ihre Eignung als Modellsysteme für menschliche Tumoren überprüft werden.

2 Einleitung

2.1 Kolorektales Karzinom

2.1.1 Überblick

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung und die vierthäufigste krebssbedingte Todesursache des Erwachsenen, trotz erheblicher Fortschritte bei der Früherkennung und Therapie. Der durchschnittliche Erkrankungszeitpunkt (mit Ausnahme familiärer Formen) liegt innerhalb der sechsten Lebensdekade. Die Mutation spezifischer Gene gilt als krankheitsursächlich (siehe Kapitel 2.1.2). Mit einem Anteil von etwa 98 Prozent handelt es sich beim KRK um die weitaus häufigste maligne Tumorentität des Darmtrakts, wobei histologisch Adenokarzinome mit etwa 95 Prozent überwiegen. Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des KRK gehören eine positive Familienanamnese, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Elemente des westlichen Lebensstils wie Bewegungsmangel, Übergewicht sowie ballaststoffarme und fleischreiche Ernährung (Marmol et al. 2017). Am häufigsten ist das KRK im Rektum lokalisiert, gefolgt von Sigma und Kolon. Nach der Einteilung der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) werden vier Stadien unterschieden: Begrenzung auf die Darmwand (I), Wachstum über die Darmwand hinaus (II), Metastasierung über die Lymphwege (III) sowie Fernmetastasierung v. a. in Leber oder Lunge (IV). Neben operativer Entfernung, Chemo- und Strahlentherapie gehören mittlerweile auch zielgerichtete, spezifische Antikörper zu den etablierten Therapieoptionen (Gordon et al. 2017).

2.1.2 Tumorgenetik

Die Mehrheit (70-80 %) der KRK tritt sporadisch auf, während 20-30 % eine hereditäre Komponente aufweisen. Hierzu zählen Niedrigrisiko-Allele, die in genomweiten Studien ermittelt wurden (10-20 %), sowie Hochrisiko-Allele im Rahmen hereditärer Syndrome wie dem Lynch-Syndrom (3-4 %) und der Familiären Adenomatösen Polyposis (ca. 1 %) (Müller et al. 2016).

Eine sogenannte genetische Instabilität ist gemeinsames Kennzeichen aller KRK. Anhand derer zugrundeliegenden Mechanismen werden drei Gruppen unterschieden (Shiller und Boostrom 2015, Marmol et al. 2017): (1) KRK mit chromosomaler Instabilität (CIN) stellen mit 80-85 % die weitaus größte Gruppe dar. Sie sind gekennzeichnet durch Imbalancen der Chromosomenzahl (Aneuploidie) und Verlust der Heterozygotie. Beteiligt sind Mutationen von Genen wie *APC*, *KRAS*, *PI3K* und *TP53*. Diese Mutationen treten oftmals in einer

charakteristischen zeitlichen Reihenfolge auf, die die schrittweise Entwicklung von benignen zu malignen Tumoren (Adenom-Karzinom-Sequenz) repräsentiert. (2) KRK mit Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) bilden mit etwa 15 % eine weitere Gruppe. Ihr liegen fehlerhafte DNA-Reparaturmechanismen zugrunde, verursacht durch Mutationen von Mismatch-Repair-Genen wie *MLH*, *MSH* und *PMS*. Hierzu zählt auch das hereditäre Lynch-Syndrom. (3) Eine dritte Gruppe von KRK ist gekennzeichnet durch epigenetische Veränderungen. Sie wird als CpG-Insel-Methylator-Phänotyp (CIMP) bezeichnet. In etwa 13 % aller KRK treten Kombinationen der genannten Mechanismen auf (Müller et al. 2016). Durch die genetischen Veränderungen werden wichtige Signalwege beeinflusst, die für Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose eine Rolle spielen (Tab. 1) sowie für die Angiogenese bedeutsam sind (Überexpression von VEGF).

Tab. 1: Wichtige Signalwege beim KRK (Marmol et al. 2017)

| Signalweg | wichtige assoziierte Gene und Proteine |
|---------------|--|
| WNT | <i>APC</i> , β -Catenin, <i>MYC</i> |
| MAPK und PI3K | <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> (PI3K), <i>PTEN</i> , EGFR |
| TGF- β | TGF- β , <i>SMAD2</i> , <i>SMAD4</i> |

Basierend auf den genannten Erkenntnissen, können bereits einige genetische Faktoren als prognostische Marker genutzt werden, darunter die prognostisch günstige Überexpression von *MYC* sowie die prognostisch schlechteren Mutationen von *KRAS* und *BRAF*. Weiterhin werden, wie bereits erwähnt, zielgerichtete Antikörper und Proteine bei metastasierten Tumoren zusätzlich zur klassischen Chemotherapie eingesetzt. Zu ihnen zählen Bevacizumab und Aflibercept, welche VEGF blockieren, sowie Cetuximab und Panitumumab, die gegen EGFR wirken, allerdings nur bei Abwesenheit einer *KRAS*-Mutation. Weitere Wirkstoffe befinden sich in der klinischen Forschung, im Sinne einer zunehmend „maßgeschneiderten Therapie“ für einzelne molekulare Subtypen (Rodriguez-Salas et al. 2017, Marmol et al. 2017).

2.1.3 Tumorzytogenetik

Das Arbeitsgebiet der Zytogenetik beschäftigt sich mit der Untersuchung von Anzahl und Struktur der Chromosomen. Tumoren sind typischerweise zytogenetisch instabil – es kommt neben veränderten Chromosomenzahlen auch zur fehlerhaften DNA-Reparatur und Doppelstrangbrüchen (chromosomale Bruchpunkte). Die Folge sind Translokationen, die balanciert (ohne) oder unbalanciert (mit DNA-Verlust oder -Zugewinn) auftreten können, sowie Insertionen, Inversionen, Duplikationen und Deletionen (Lobo 2008).

KRK, die zur Gruppe der chromosomal instabilen Tumoren gehören (siehe Kapitel 2.1.2), weisen eine Reihe typischer Verluste und Zugewinne auf, deren Auftreten mit einzelnen Stadien der Tumorentstehung (Abb. 1) und damit auch mit der klinischen Prognose assoziiert ist (Grade et al. 2006, Migliore et al. 2011).

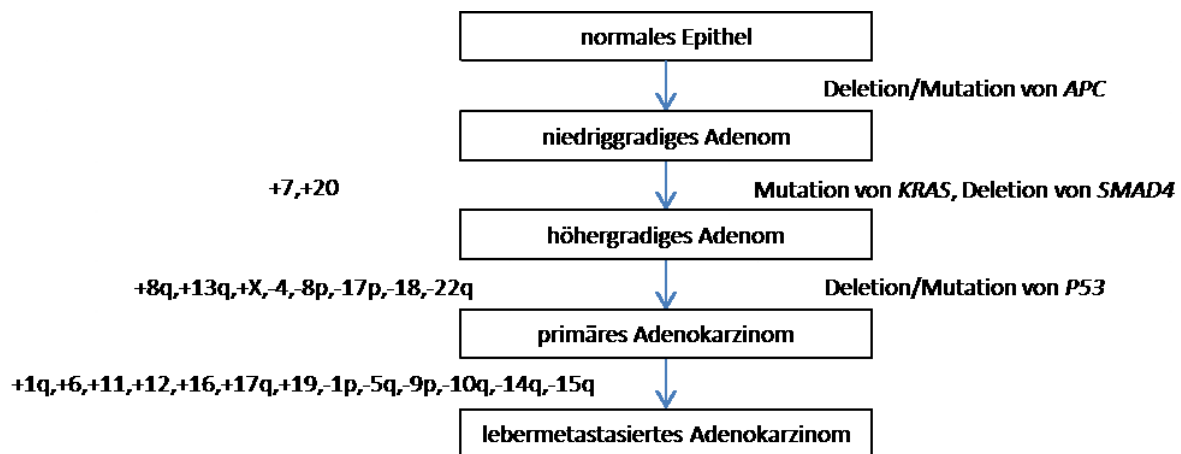


Abb. 1: Häufige chromosomale Imbalancen sowie Veränderungen ausgewählter Tumorsuppressorgene und Onkogene für die einzelnen Schritte der Tumorentstehung und -progression des KRK (verändert nach Diep et al. 2006 und Grade et al. 2006)

Darüber hinaus konnten einige dieser Aberrationen in direkten Zusammenhang mit Expressionsmustern von Onkogenen und Tumorsuppressorgen gebracht werden, beispielsweise der Verlust von *SMAD2* und *SMAD4* auf dem langen Arm von Chromosom 18. Weiterhin ist das Auftreten mehrerer Klone charakteristisch, die durch eigene Aberrationen gekennzeichnet sind und diese Eigenschaft auch unter Langzeit-in-vitro-Kultur beibehalten (Grade et al. 2006, Migliore et al. 2011).

Hinsichtlich der Tumorlokalisation (Kolon, Sigma oder Rektum, Höhe ab Anus) zeigen sich keine relevanten Unterschiede im Muster der Imbalancen (Muzny et al. 2012).

2.2 Murine Zelllinien als Modell für humane solide Tumoren

2.2.1 Eigenschaften des Mausgenoms, Vergleich zum Humangenom

Die domestizierte Hausmaus (*Mus musculus f. domestica*) gehört zur Familie der Langschwanzmäuse (*Muridae*) und zur Ordnung der Nagetiere (*Rodentia*). Die Sequenzierung des Mausgenoms wurde 2002, nur ein Jahr nach der des Humangenoms abgeschlossen. Demnach besitzt die Maus ein um 14 Prozent kleineres Genom als der Mensch (2,5 vs. 2,9 Gigabasenpaare) bei einer ebenfalls kleineren Zahl proteincodierender Gene (26.000 vs. 30.000). Etwa 99 Prozent der Gene der Maus haben eine Analogie im

Humangenom, über 90 Prozent des Genoms ist Teil korrespondierender Regionen in konservierten Abschnitten des gemeinsamen Vorfahren. Annähernd 40 Prozent der Nukleotidsequenzen finden sich im Humangenom wieder (Waterston et al. 2002).

Auf zytogenetischer Ebene besitzt die Maus einen diploiden Chromosomensatz von zweimal 19 Autosomen und 2 Gonosomen (Abb. 2 und Abb. 3) (O'Brien et al. 2006). Unter Langzeit-Zellkultur wurde eine Neigung zur Tetraploidisierung beobachtet (Zornig et al. 1995). Im Gegensatz zum Menschen sind alle Chromosomen der Maus telozentrisch, d. h. ihr Zentromer befindet sich am Chromosomenende, wobei die evolutionäre Ursache hierfür unbekannt ist. Bedingt durch diese Eigenschaft, tritt das Phänomen der Robertson-Translokation besonders häufig auf. Hierbei fusionieren zwei telozentrische Chromosomen im Bereich ihrer beiden Zentromere zu einem metazentrischen (isodizentrischen) Chromosom. Infolge dessen kommt es zum Verlust kleinerer Sequenzabschnitte im Zentromerbereich. Der Chromosomensatz verringert sich und kann zwischen den Individuen erheblich variieren (Garagna et al. 2014).

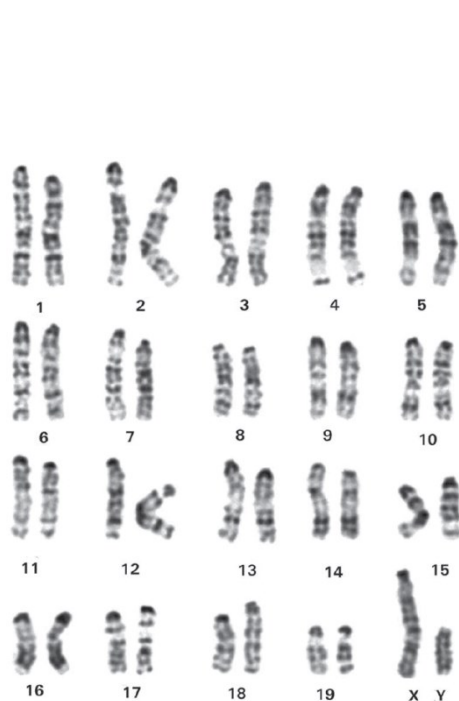


Abb. 2: Karyogramm einer männlichen Maus in der G-Bänderung (O'Brien et al. 2006)

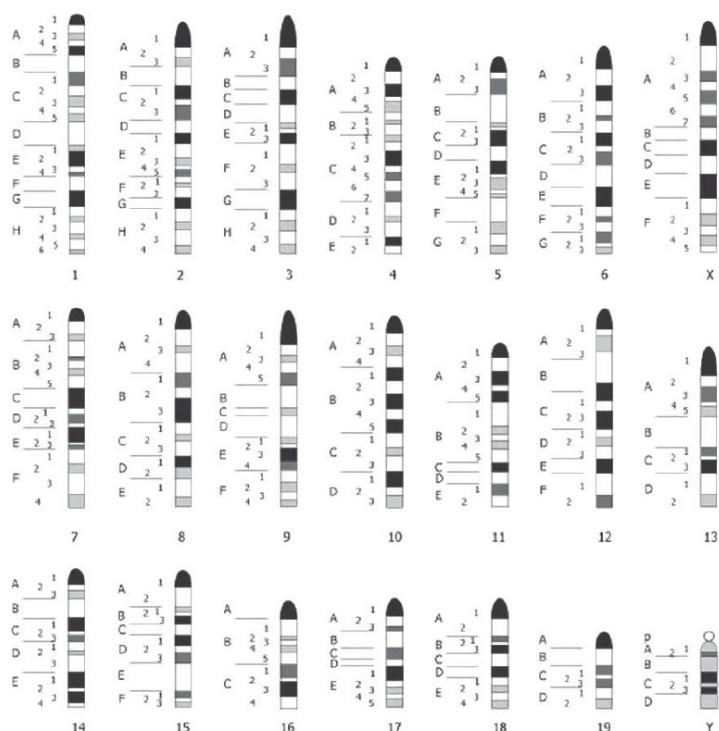


Abb. 3: Chromosomensatz der Maus, dargestellt in Idiogrammen der G-Bänderung (O'Brien et al. 2006)

2.2.2 Entwicklung und Anwendung muriner Zelllinien

Die Maus ist seit vielen Jahrzehnten als Modellorganismus für die medizinische Forschung etabliert. Durch ihre vergleichsweise leichte Züchtbarkeit (geringe Körpergröße, kurze Regenerationszeit) und ihre grundsätzliche Ähnlichkeit zum Menschen hinsichtlich Genetik

und Körperbau bietet sie einige Vorteile gegenüber anderen Tierspezies als Versuchsmodell. Neben der Maus als Gesamtorganismus und der Entwicklung embryonaler Stammzelllinien werden seit den 1960er Jahren auch murine Tumorzelllinien genutzt (Carver und Pandolfi 2006). Die meisten dieser Zelllinien wurden *in vivo* chemisch induziert, indem kanzerogene Substanzen wiederholt in das entsprechende Organ appliziert wurden.

Murine Zelllinien von soliden Tumoren finden Einsatz bei diversen Untersuchungen zur Tumorbilogie wie auch zur Testung neuer Behandlungsansätze durch spezifische Substanzen. Trotz ihrer vielfältigen Anwendung wurden gelegentlich Zweifel an der Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen geäußert (Talmadge et al. 2007). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die meisten Zelllinien nur unvollständig genetisch charakterisiert worden sind. Molekular- und zytogenetische Eigenschaften verschiedener Tumorentitäten haben sich als wegweisend für das Verständnis der menschlichen Tumorbilogie erwiesen (siehe hierzu Kapitel 2.1.2 und 2.1.3). Nur durch eine solche Charakterisierung muriner Zelllinien ist ein direkter Vergleich zum Menschen überhaupt möglich.

2.2.3 CMT-93 und CT26.WT als Modell für das KRK

Die murinen Tumorzelllinien CMT-93 und CT26 gehören zu den am häufigsten verwendeten Mausmodellen für das KRK (Golovko et al. 2015). Sie wurden durch Alkylanzien induziert, die selektiv Tumoren im Darmtrakt hervorrufen (Rosenberg et al. 2009). Diese Tumoren zeigen in ihren genetischen und morphologischen Eigenschaften große Ähnlichkeiten zum sporadischen humanen KRK (De Robertis et al. 2011, Tong et al. 2011). Die Inzidenz spontan auftretender Darmtumoren bei der Maus ist mit weniger als 1 Prozent relativ gering (Evans et al. 2016).

CMT-93 (zur Abkürzung CMT keine Literaturangaben verfügbar) wurde erstmals durch Franks und Hemmings (1978) beschrieben. Sie injizierten einer männlichen Inzucht-Maus (C57BL ICRF a') wöchentlich über 18 Monate Methylazoxymethanolazetat und isolierten Tumorzellen aus der vierten *in vivo* Passage der Explantat-Kultur des Rektums (Franks und Hemmings 1978). CMT-93 ist eine epithelial differenzierte, adhärente, hyperdiploide Zelllinie und fand bis heute in mehr als 60 publizierten Studien Verwendung, unter anderem zur Wirkung therapeutischer Substanzen, zu immunologischen Untersuchungen wie auch zu Tests bei induzierten Infektionen. Eine erstmalige Analyse von Transkriptionsfaktoren erfolgte 2016. Demnach ist in CMT-93 der WNT-Signalweg durch Wechselwirkung mit

anderen Signalwegen gehemmt, während verschiedene tumorassoziierte Transkriptionsfaktoren und sogenannte Master-Regulatoren wie MLK3 und MAPK1 (ERK2) aktiviert sind und somit für die Proliferation, Migration und das invasive Potential der Zelllinie bedeutsam sein könnten (Wlochowicz et al. 2016). Weitergehende genetische, insbesondere zytogenetische Untersuchungen von CMT-93 erfolgten bisher nicht.

CT26 (Colon Tumor 26) wurde durch Griswold und Corbett (1975) etabliert. Einer weiblichen Inzucht-Maus (BALB/c) wurden zweimal wöchentlich über 6 Monate N-nitroso-N-methylurethan intrarektal appliziert. CT26 wurde aus dem Kolon-Transplantat der 18. Generation isoliert. Es handelte sich um ein undifferenziertes Grad-IV-Karzinom mit einer Metastasierungsrate von 70 bis 100 Prozent (Griswold und Corbett 1975). Die Zelllinie ist adhärent und zeigt eine Fibroblasten-Morphologie. Der Zellklon CT26.WT wurde 1995 entwickelt, um die antigene Heterogenität zu minimieren (Wang et al. 1995). Die Zelllinie wurde bis heute in über 500 publizierten Studien verwendet, insbesondere zur Testung zytotoxischer Substanzen und von therapeutischen Wirkstoffen mit Angriffspunkten an spezifischen Signalwegen. Die erste ausführliche genetische Untersuchung von CT26.WT erfolgte 2014. Castle et al. verwendeten eine Komplett-Sequenzierung (Next Generation Sequencing) sowie einen Algorithmus zur Ermittlung der gesamten Kopiezahl durch Vergleich der Genfrequenz mit der von BALB/cJ-Mäusen. Im Ergebnis zeigte CT26.WT eine inhomogene Kopiezahl mit großen Abschnitten von Triploidie (45 Prozent) und Tetraploidie (39 Prozent der Gene). Das X-Chromosom liegt diploid vor bei fehlender X-Inaktivierung, sodass beide Allele transkribiert werden. Homozygote Sequenz-Cluster finden sich auf Chromosom 6 (vierfache), 13, 14 (dreifache), 15 (fünffache) und X (zweifache Amplifikation). Nur eine homozygote Deletion wurde gefunden. Sie betrifft das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* auf Chromosom 4. Die Mutationsanalyse ergab eine vergleichsweise hohe Mutationsrate, wie sie für die Induktion durch Alkylanzien typisch ist. An tumorrelevanten Genen und Mismatch-Repair-Genen ist nur *KRAS* mutiert und liegt triploid vor. Die Gene *MAPK1* (*MEK*) und *MET* sind amplifiziert und lassen eine Sensitivität gegenüber therapeutisch wirksamen Inhibitoren vermuten. Die Analyse der Genexpression zeigte hohe Expressionsraten der meisten tumorrelevanten Gene, vereinbar mit einer aggressiven und hohen metastatischen Aktivität von CT26.WT. EGFR wird nicht exprimiert, womit sich CT26.WT therapierefraktär gegenüber anti-EGFR-Wirkstoffen zeigt. Eine Analyse der Differenzierungsmarker zeigte das Muster eines hochproliferativen, undifferenzierten Tumorstadiums. Alle gefundenen Mutations- und Expressionsprofile zeigen Ähnlichkeiten

zum sporadischen, undifferenzierten, therapierefraktären, metastasierenden KRK beim Menschen (Castle et al. 2014). Ebenso wie für CMT-93 ist auch für CT26.WT eine molekular-zytogenetische Charakterisierung bisher nicht erfolgt.

2.3 Methodische Grundlagen

2.3.1 Klassische Zytogenetik

Zu den Methoden der Zytogenetik gehören Bänderungstechniken, mit denen bestimmte Bereiche innerhalb des Chromosoms stärker (dunklere) oder schwächer (hellere Banden) angefärbt werden. Für die Untersuchung menschlicher Chromosomen ist die G (Giemsa) oder GTG (G-bands by trypsin using Giemsa)-Bänderung am weitesten verbreitet. Auch für die Chromosomen der Maus konnten durch G-Bänderung Idiogramme, d. h. schematisierte Darstellungen des Bänderungsmusters erstellt werden (Abb. 3 Seite 12). Qualitativ gleichwertig und besonders für die FISH geeignet ist außerdem die invertierte DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)-Bänderung (Bayani und Squire 2004). Die praktische Anwendung klassischer Bänderungstechniken wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass sich die Mausechromosomen morphologisch ähneln (telozentrische Chromosomen), nur geringe Größenunterschiede aufweisen und die Bandenmuster mehrerer Chromosomen schwer voneinander zu unterscheiden sind (Leibiger et al. 2013). Erst molekular-zytogenetische Methoden haben die genaue Untersuchung der Mausechromosomen ermöglicht.

2.3.2 Molekulare Zytogenetik

2.3.2.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) sind bestimmte Abschnitte einzelsträngiger DNA (Sonden) mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Fluorochrom) markiert und werden durch Hybridisierung an den ihnen komplementären DNA-Strang innerhalb eines Chromosoms gebunden (Abb. 4). Anschließend können sie durch Lichtmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die Sonden können molekulargenetisch hergestellt (lokus- und zentromerspezifische Sonden) oder durch Chromosomen-Mikrosezierung erzeugt werden (Teil- und Ganzchromosomensonden). Bei letztgenannter Technik werden ganze Chromosomen oder ihre Teilstücke aus Metaphasen mit feinen Glasnadeln herausgeschnitten und ihre DNA anschließend mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Farbmarkierung (Labeling) der Sonden erfolgt direkt durch eingebaute Fluorochrome oder indirekt durch Haptene (z. B. Biotin oder Digoxigenin), an welche

nachträglich Antikörper (oder Avidin im Falle von Biotin) binden, an die wiederum ein Fluorochrom angelagert ist. Häufig eingesetzte Verfahren zum Labeling sind die sogenannte Nick-Translation und PCR (Liehr 2017). Zu den praktischen Arbeitsschritten siehe Kapitel 3.2 bis 3.5.

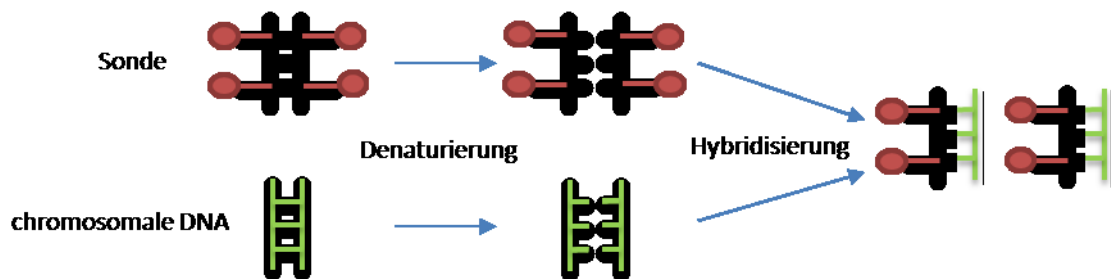


Abb. 4: Prinzip der FISH

FISH findet breite Verwendung für die Charakterisierung erblicher oder erworbener chromosomaler Aberrationen, für die Genkartierung sowie für Untersuchungen zur Karyotyp-Evolution und Interphase-Zellkernarchitektur. Die Auflösungsrate liegt (je nach Sonde) im Bereich von bis zu wenigen Kilobasenpaaren. Die Methode setzt voraus, dass die zu untersuchende DNA-Sequenz bekannt ist, um eine entsprechende Sonde herstellen zu können (Liehr 2017).

2.3.2.2 Multicolor-FISH

Bei der Multicolor-FISH (mFISH) werden mehrere Sonden gleichzeitig eingesetzt und sind mit (i. d. R. fünf) verschiedenen Fluorochromen markiert. Geschieht dies mit Ganzchromosomen-Sonden, so erhält jedes Chromosom durch eine spezielle Kombination von Fluorochromen seinen eigenen Farbton, der i. d. R. in Falschfarben dargestellt wird, und kann somit eindeutig zugeordnet werden (Whole Chromosome Painting, WCP, vergleiche Tab. 2 Seite 22). Anhand des Prinzips der Bildaufnahme und -verarbeitung wird zwischen Multiplex-FISH (M-FISH) und Spektraler Karyotypisierung (SKY) unterschieden.

mFISH wurde 1996 für menschliche und murine Chromosomen etabliert. Bei der Maus ermöglichte sie im Gegensatz zur konventionellen Zytogenetik auch die Karyotypisierung komplexer chromosomaler Aberrationen. Dargestellt werden können Chromosomenabschnitte mit einer Auflösung von bis zu 5 Megabasenpaaren. Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass intrachromosomale Rearrangements (Inversion, Duplikation, Deletion) nicht untersucht werden können (Schröck et al. 2006, Kearney 2006).

2.3.2.3 Murines Multicolor Banding

Beim Multicolor Banding (MCB) werden Sonden für verschiedene Abschnitte desselben Chromosoms mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert, sodass die Signalintensitäten über die Länge des Chromosoms in spezifischer Weise variieren (vergleiche Abb. 6 Seite 25). Das so entstandene Bandenmuster kann analog zur mFISH in Falschfarben dargestellt werden (Abb. 5). MCB ermöglicht die Differenzierung einzelner Chromosomenabschnitte mit einer Auflösung bis auf das Niveau der G-Bänderung (etwa 5 Megabasenpaare). Intrachromosomale Rearrangements können eindeutig dargestellt und Bruchpunkte vergleichsweise genau lokalisiert werden. Darüber hinaus ist eine Analyse unabhängig vom Kondensationsgrad der Chromosomen möglich (Kosyakova et al. 2013a). Auch gegenüber Verfahren wie der array-CGH (siehe Kapitel 2.3.3) hat sich das MCB als hilfreich und unverzichtbar bei der sicheren Abgrenzung und Zuordnung chromosomaler Rearrangements erwiesen (Bint et al. 2013). Grenzen der Methode ergeben sich durch ihre geringere Auflösungsrate als FISH-Verfahren mit kleineren Sonden (BAC-FISH), array-CGH oder Sequenzierung.

Ein murines MCB (mcb) für alle 19 Autosomen und beide Gonosomen der Maus wurde von 2005 bis 2013 am Institut für Humangenetik in Jena entwickelt (Kosyakova et al. 2013a, Kosyakova et al. 2013b) und erfolgreich für die zytogenetische Charakterisierung zahlreicher muriner Tumorzelllinien angewandt (Leibiger et al. 2013, Kubicova et al. 2017, Guja et al. 2017).

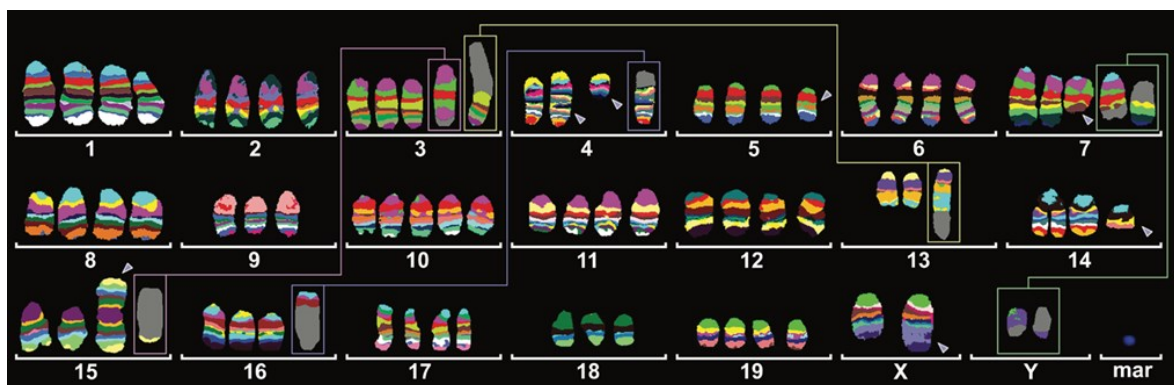


Abb. 5: mcb für alle 19 Autosomen und beide Gonosomen der Maus, dargestellt in Falschfarben am Beispiel der Tumorzelllinie NIH 3T3 (Leibiger et al. 2013)

2.3.3 Array-based Comparative Genomic Hybridization

Die Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (array-based Comparative Genomic Hybridization, array-CGH) beruht auf folgendem Prinzip: DNA-Fragmente, deren genaue chromosomale Lokalisation bekannt ist, werden amplifiziert und auf einen speziellen

Objektträger (Array) aufgebracht. Aus zwei Zellmaterialien (i. d. R. die zu analysierende Probe sowie Vergleichsmaterial derselben Spezies) wird die DNA isoliert und mit zwei verschiedenen Fluorochromen (z. B. grün und rot) markiert. Anschließend werden die beiden Proben im Verhältnis 1 : 1 gemischt und mit den genannten DNA-Fragmenten hybridisiert. Das Ergebnis wird mikroskopisch aufgenommen: Je nachdem, ob mehr Proben- oder Vergleichs-DNA auf ein Fragment hybridisiert wurde (d. h. Amplifikation bzw. Deletion der Proben-DNA), entsteht ein grünes bzw. rotes Signal. Sind gleichviel Proben- und Vergleichs-DNA vorhanden, entsteht ein Mischsignal. Durch Software-Verarbeitung lässt sich die chromosomale Lokalisation der Signale rekonstruieren.

Die array-CGH ist seit 2004 für die Maus verfügbar (Chung et al. 2004) und ermöglicht die Erfassung von Kopiezahlveränderungen einzelner Genomabschnitte im Vergleich zur gesamten Kopiezahl mit wählbar verschieden hohen Auflösungsraten (200 Kilobasen- bis 5 Megabasenpaare). Sie findet unter anderem Einsatz in der Tumorgenetik und der Pränataldiagnostik. Die Grenzen der Methode bestehen darin, dass nur unbalancierte Aberrationen (Deletionen und Amplifikationen) erfasst werden und keine sichere Aussage über Gesamt-Kopiezahl und Ploidiegrad möglich ist. Weiterhin werden nur Imbalancen erfasst, die sich in mindestens 30 bis 50 Prozent der Zellen wiederfinden. Mosaik und einzelne Zellklone können meist nicht differenziert werden (Cho et al. 2006).

2.3.4 In-silico-Translation

Seit Abschluss der Sequenzierung von Human- und Mausgenom (vergleiche Kapitel 2.2.1) sind öffentliche Datenbanken verfügbar, mit denen Genomabschnitte der Mausechromosomen ihren homologen Regionen auf den menschlichen Chromosomen zugeordnet werden können (Leibiger et al. 2013).

2.4 Ziele der Arbeit

Trotz ihrer häufigen Verwendung als Modellsystem für das KRK wurden die beiden hier untersuchten murinen Tumorzelllinien CMT-93 und CT26.WT bisher nicht molekularzytogenetisch charakterisiert und sind dadurch mit der menschlichen Tumorgenetik nicht direkt vergleichbar. Daher stellt sich die vorliegende Arbeit jeweils für CMT-93 und CT26.WT folgende Ziele:

1. Durch Methoden der molekularen Zytogenetik (mFISH und mcb) soll eine erstmals vollständige zytogenetische Beschreibung erfolgen, wobei Ploidie, numerische und strukturelle Aberrationen sowie klonale und nichtklonale Veränderungen erfasst und die zugehörigen Bruchpunkte lokalisiert werden.
2. Durch array-CGH sollen die in Punkt 1 ermittelten Imbalancen und Bruchpunkte nochmals überprüft und gegebenenfalls exakter lokalisiert werden. Diese Ergebnisse sollen
3. durch in-silico-Translation ihren homologen Regionen im Humangenom zugeordnet werden, um sie
4. durch Literaturvergleich auf Übereinstimmungen mit zytogenetischen Veränderungen des KRK zu überprüfen und die Zelllinien gegebenenfalls einem Tumorstadium zuzuordnen.

3 Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur.

3.1 Zellkultur

Zellkultur und Chromosomenpräparation erfolgten durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Molekulare Zytogenetik am Institut für Humangenetik in Jena. Beide Zelllinien wurden erworben von der American Type Culture Collection (ATCC) mit den Katalognummern:

- CMT-93: CCL-223
- CT26.WT: CRL-2638

Die Kultur erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers für die jeweiligen Katalognummern. Beide Zelllinien wurden in sterilen Flaschen bei 37 °C in einer Atmosphäre von 95 % Raumluft und 5 % CO₂ kultiviert. Als Basis-Kulturmedien wurden verwendet:

- CMT-93: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC, 30-2002)
- CT26.WT: RPMI-1640 Medium (ATCC, 30-2001)

Für das komplette Kulturmedium wurde jeweils fetales bovines Serum (ATCC, 30-2020) in finaler Konzentration von 10 % hinzugefügt. Als die Zellen eine Konfluenz von 75 % erreichten, wurde sie auf zwei Flaschen verteilt, wovon die eine für die Chromosomenpräparation (Kapitel 3.2) und die andere für die DNA-Extraktion genutzt wurde. Für Letzteres wurde das Blood & Cell Culture DNA Midi Kit® (Quiagen) nach den Herstellerangaben verwendet.

3.2 Präparation der Chromosomen

Reagenzien:

- Colcemid (10 µg/ml, Biochrom L 6221)
- Fixativ-Lösung (Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1)
- hypotone Lösung (339 mg Kaliumchlorid in 100 ml *Aqua ad iniectabilia*, Braun)
- Trypsin/EDTA-Lösung 0,05 %/0,02 % (Biochrom)

Die Zellkultur wurde durch Zugabe von 100 µl Colcemid pro Flasche (entspricht einer Konzentration von 0,1 µg/ml) unterbrochen und für 3 Stunden inkubiert. Hierdurch kommt es zur Hemmung des Spindelapparates. Sich teilende Zellen verbleiben im Stadium der Metaphase und liegen vollständig kondensiert in einer Ebene (Metaphaseplatte) vor.

Anschließend wurde die Zellsuspension durch Trypsin/EDTA-Lösung aus der Flasche gelöst, für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand durch Aspiration entfernt. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml des Überstands resuspendiert. 10 ml der 37 °C warmen hypotonen Lösung wurden hinzugegeben und 20 Minuten inkubiert. Hierdurch kommt es zum Schwellen und Spreiten der Chromosomen, was die spätere mikroskopische Untersuchung erleichtert. Durch Zugabe von 1 ml der 4 °C kalten Fixativ-Lösung wurden alle biologischen Prozesse beendet und die Chromosomen morphologisch konserviert. Zentrifugieren und Resuspendieren des Materials wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen bei –20 °C tiefgefroren.

3.3 Auftropfen der Zellsuspension auf den Objektträger

Reagenzien:

- *Aqua dest.* (Milli-Q®, Merck)
- Fixativ-Lösung (Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1)

Zur in-situ-Hybridisierung und mikroskopischen Aufnahme ist eine optimale Anordnung der Chromosomen und Metaphasen auf dem Objektträger (idealerweise eine Glasoberfläche) erforderlich. Ein dafür nötiges Protokoll wurde vom Institut für Humangenetik in Jena entwickelt (Claussen et al. 2002) und entsprechend den Eigenschaften der verwendeten Zellsuspensionen modifiziert.

Die Objektträger (Menzel Gläser®) wurden über mindestens 20 Minuten in *Aqua dest.* auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden 20 µl der im Verhältnis 1:1 mit Fixativ-Lösung verdünnten Zellsuspension durch eine Mikropipette über 2 bis 3 Tropfen auf den Objektträger aufgetragen. Sofort danach wurden 10 bis 20 µl Fixativ-Lösung durch Mikropipette auf dem Objektträger verteilt, um die aufgetragenen Metaphasen weiter zu spreiten. Danach wurden die Objektträger für mindestens 2 Tage, höchstens 5 Tage bei Raumluft getrocknet.

3.4 mFISH

Das Protokoll wurde modifiziert nach Liehr (2017). Als Sondenmix wurde SkyPaint™ DNA Kit M-10 for Mouse Chromosomes (ASI, FPRPR0030) verwendet (Tab. 2).

Tab. 2: SkyPaint™ Farbcode mit 5 Fluorochromen zur Identifizierung aller Mauschromosomen

| Chromosom | FITC | Orange | Texas Red | Cy-5 | Pacific Blue |
|-----------|------|--------|-----------|------|--------------|
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| 6 | | | | | |
| 7 | | | | | |
| 8 | | | | | |
| 9 | | | | | |
| 10 | | | | | |
| 11 | | | | | |
| 12 | | | | | |
| 13 | | | | | |
| 14 | | | | | |
| 15 | | | | | |
| 16 | | | | | |
| 17 | | | | | |
| 18 | | | | | |
| 19 | | | | | |
| X | | | | | |
| Y | | | | | |

3.4.1 Postfixation

Reagenzien:

- *Aqua dest.* (Milli-Q®, Merck)
- Ethanol (Roth, mit *Aqua dest.* in Konzentrationen von 70, 95 und 100 %)
- 1xPBS (47,75 g PBS (Biochrom® 15557-036) in 5 Liter *Aqua dest.*)
- Post-Fixativ-Lösung (500 µl Paraformaldehyd (2 g Paraformaldehyd-Pulver (Sigma®) gelöst in 100 ml 1xPBS und 10 µl 1N Natriumhydroxid bei 70 °C), 450 µl 1xPBS, 50 µl 1M Magnesiumchlorid-Lösung)

Auf einen Pepsin-Verdau, welcher Bestandteil des Referenzprotokolls ist, wurde aufgrund seiner destruktiven Wirkung auf die verwendeten Chromosomenpräparate verzichtet.

Die Objektträger wurden für 1 Minute in 1xPBS gegeben. Anschließend wurden sie mit jeweils 100 µl Post-Fixativ-Lösung für 10 Minuten unter einem Deckglas inkubiert. Hierdurch wird eine verbesserte DAPI-Färbung erreicht und eventuell durch Pepsin-Verdau veränderte Strukturen werden chemisch stabilisiert. Danach wurden die Objektträger wieder für 5 Minuten in 1xPBS gegeben, kurz mit *Aqua dest.* gespült, in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen jeweils 3 Minuten dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

3.4.2 Denaturierung des Objektträger-Materials

Reagenzien:

- 70 % Formamid (70 ml Formamid (Sigma), 10 ml 20xSSC (Invitrogen), 20 ml *Aqua dest.*)

In diesem Schritt wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten, um die Hybridisierung zu ermöglichen. Die Objektträger wurden für 3 Minuten mit jeweils 100 µl 70 % Formamid auf einer Heizplatte bei 72 °C inkubiert. Dabei senkt Formamid den Schmelzpunkt der DNA. Sofort danach wurden sie für 3 Minuten in –20 °C kalte 70 % Ethanol-Lösung und anschließend jeweils 3 Minuten in raumtemperierte 95 und 100 % Ethanol-Lösung gegeben. Danach wurden die Objektträger bis zur Hybridisierung für etwa 3 Minuten luftgetrocknet.

3.4.3 Denaturierung der Sonde

Der Sondenmix wurde für 5 bis 10 Minuten auf dem Schüttler auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde er im Thermocycler (DNAEngine®, BIO-RAD) mit folgendem Programm denaturiert:

- 7 min bei 80 °C
- 2 min bei 4 °C
- 10 min bei 37 °C
- ∞ bei 4 °C

3.4.4 Hybridisierung

Sofort nach Beendigung der Sonden-Denaturierung wurden 10 µl des Sondenmix auf den Objektträger aufgetragen, ein 24x24 mm Deckglas aufgelegt und die Ränder mit Kautschukkleber (Fixogum®, Marabu) verschlossen. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37 °C für etwa 48 Stunden.

3.4.5 Posthybridisierungsschritte (Waschen und Detektion)

Reagenzien:

- *Aqua dest.* (Milli-Q®, Merck)
- 0,4xSSC (10 ml 20xSSC (Invitrogen) in 490 ml *Aqua dest.*, pH 7-7,5)
- 4xSSC/0,05 % Tween (100 ml 20xSSC, 400 ml *Aqua dest.*, 250 µl Tween 20® (Sigma), pH 7-7,5)
- Marvel® Lösung (0,1 g Milchproteinpulver in 2 ml 4xSSC/0,05 % Tween)

- SA-Cy5 (Streptavidin, Amersham)
- Anti-Digoxigenin (Sigma)
- Pacific BlueTM (F(ab')₂ Fragment von Ziegen anti-Maus IgG (H+L), Life Technologies, 2 mg/ml)
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol (Merck) in Vectashield[®] Mounting Medium 0,75:1000)

Deckglas und Kautschukkleber wurden entfernt. Um die Hybridisierung zu stoppen, wurden die Objektträger in 70-73 °C warmes 0,4xSSC für 4 Minuten gegeben. Danach erfolgte eine Spülung in 4xSSC/0,05 % Tween auf dem Schüttler für 5 Minuten. Anschließend wurden 100 µl Marvel-Lösung aufgetragen und unter einem Deckglas in einer feuchten Kammer für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Hierdurch werden alle freien Bindungsstellen blockiert. Danach erfolgte eine erneute Spülung in 4xSSC/0,05 % Tween für 1 Minute. Jeweils 100 µl Marvel-Lösung, 2,5 µl Anti-Digoxigenin und 5 µl SA-Cy5 wurden aufgetragen und unter einem Deckglas in einer feuchten Kammer für 30-40 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für jeweils 5 Minuten in 4xSSC/0,05 % Tween gewaschen. Jeweils 100 µl Marvel-Lösung und 4 µl Pacific BlueTM wurden aufgetragen und unter einem Deckglas in einer feuchten Kammer für 30-40 Minuten inkubiert. Erneut wurde gewaschen wie im Schritt zuvor. Die Objektträger wurden kurz mit *Aqua dest.* gespült und anschließend für jeweils 3 Minuten in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen von 70, 95 und 100 % dehydriert. Jeweils 20 µl DAPI wurden aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt. DAPI ermöglicht die unspezifische Darstellung (Bänderung) aller Chromosomen als Bildgrundlage für die durch FISH erzeugten Fluoreszenzsignale. Die fertigen Objektträger wurden unter Lichtabschluss bei 4 °C aufbewahrt und spätestens nach 3 Tagen mikroskopisch aufgenommen.

3.4.6 Fluoreszenz-Mikroskopie und Datenanalyse

Mindestens 40 Metaphasen von jeder Zelllinie wurden in 1000-facher Vergrößerung aufgenommen über ein Axioplan-Mikroskop (Carl Zeiss Jena), ausgestattet mit fünf automatischen Filtern (getrennte Aufnahme, Multiplex-FISH), einer Standard-CCD-Kamera und verknüpft mit der Imaging-Software ISIS[®] (Integrated Software for Imagers and Spectrometers, Metasystems). Die Aufnahmen wurden bearbeitet und analysiert mit ISIS und Paintshop Pro X4[®] (Microsoft).

3.5 mcb

Das Protokoll wurde modifiziert nach Liehr (2017). Für die genaue Erläuterung der einzelnen Schritte siehe Kapitel 3.4. Die Sonden wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Molekulare Zytogenetik am Institut für Humangenetik in Jena durch Chromosomen-Mikrodissektion hergestellt (Abb. 6) (Kosyakova et al. 2013b, Leibiger et al. 2013).

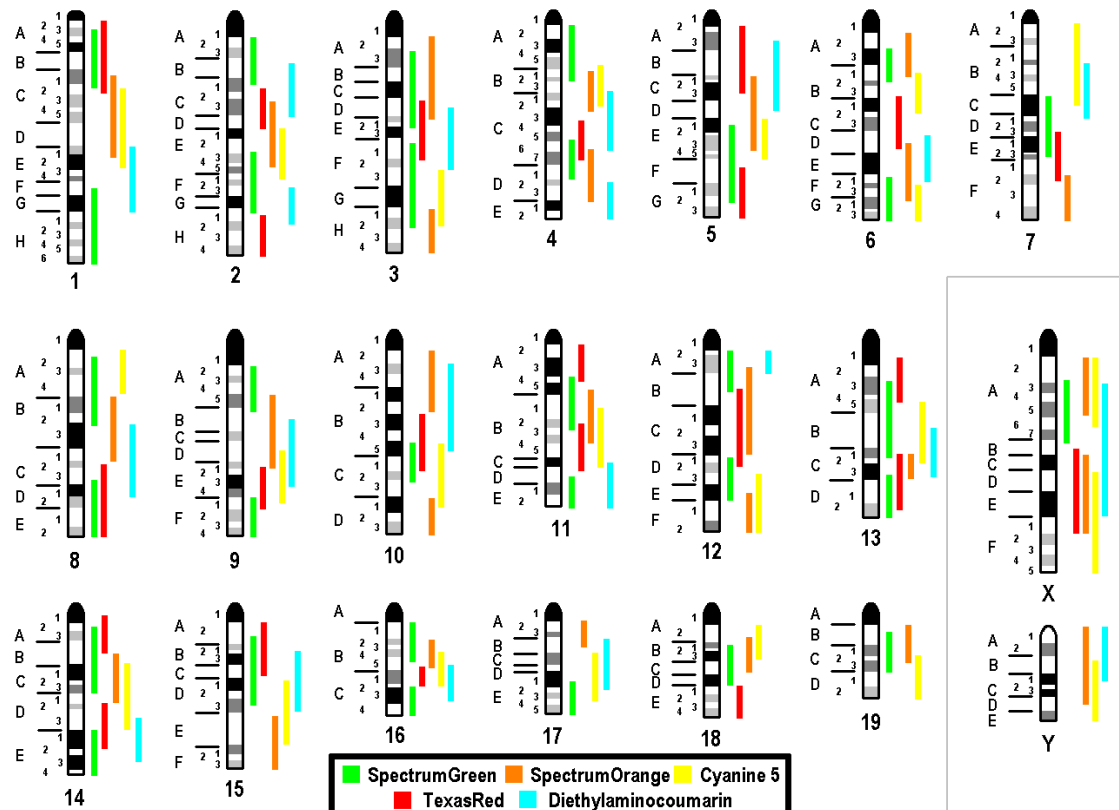


Abb. 6: Labeling-Schema für das am Institut für Humangenetik in Jena entwickelte mcb mit 5 Fluorochromen, mcb Y findet aktuell keine Verwendung (verändert nach Leibiger et al. 2013)

3.5.1 Postfixation

Dieser Schritt erfolgte analog zur mFISH (Kapitel 3.4.1).

3.5.2 Denaturierung des Objektträger-Materials

Dieser Schritt erfolgte analog zur mFISH (Kapitel 3.4.2).

3.5.3 Denaturierung der Probe

Der Sondenmix wurde für 5 bis 10 Minuten auf dem Schüttler auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde er im Thermocycler (DNAEngine®, BIO-RAD) mit folgendem Programm denaturiert:

5 min bei 85 °C

2 min bei 4 °C

30 min bei 37 °C

∞ bei 4 °C

3.5.4 Hybridisierung

Sofort nach Beendigung der Proben-Denaturierung wurden jeweils 10 µl des Sondenmix auf den Objektträger aufgetragen, ein 24x24 mm Deckglas aufgelegt und die Ränder mit Kautschukkleber (Fixogum®, Marabu) verschlossen. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37 °C für etwa 24 Stunden.

3.5.5 Posthybridisierungsschritte (Waschen und Detektion)

Reagenzien:

- *Aqua dest.* (Milli-Q®, Merck)
- 0,4xSSC (10 ml 20xSSC (Invitrogen) in 490 ml *Aqua dest.*, pH 7-7,5)
- 4xSSC/0,05 % Tween (100 ml 20xSSC, 400 ml *Aqua dest.*, 250 µl Tween 20® (Sigma), pH 7-7,5)
- 1xPBS (47,75 g PBS (Biochrom, 15557-036) in 5 Liter *Aqua dest.*)
- Marvel® Lösung (0,1 g Milchproteinpulver in 2 ml 4xSSC/0,05 % Tween)
- SA-Cy5 (Streptavidin, Amersham)
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol (Merck) in Vectashield® Mounting Medium 0,75 : 1000)

Deckglas und Kautschukkleber wurden entfernt. Um die Hybridisierung zu stoppen, wurden die Objektträger in 64-65 °C warmes 0,4xSSC für 5 Minuten gegeben. Danach erfolgte eine Spülung in 4xSSC/0,05 % Tween für 5 Minuten. Anschließend wurden 100 µl Marvel-Lösung aufgetragen und unter einem Deckglas in einer feuchten Kammer für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Spülung in 4xSSC/0,05 % Tween für 1 Minute. Jeweils 100 µl Marvel-Lösung und 6-8 µl SA-Cy5 wurden aufgetragen und unter Deckglas in feuchter Kammer für 35-45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger viermal für jeweils 5 Minuten in 4xSSC/0,05 % Tween gewaschen, danach für 3-5 Minuten in 1xPBS gegeben und für jeweils 3 Minuten in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen von 70, 95 und 100 % dehydriert. Jeweils 20 µl DAPI wurden aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt. Die fertigen Objektträger wurden unter Lichtabschluss bei 4 °C aufbewahrt und spätestens nach 3 Tagen mikroskopisch aufgenommen.

3.5.6 Fluoreszenz-Mikroskopie und Datenanalyse

Dieser Schritt erfolgte analog zur mFISH (Kapitel 3.4.6). Analysiert wurden mindestens 30 Metaphasen pro mcb und Zelllinie.

3.6 array-CGH

Dieser Versuch wurde durchgeführt von Martina Rincic, Croatian Institute for Brain Research, School of Medicine, Universität Zagreb, Kroatien. Verwendet wurde SurePrint G3 Mouse CGH Microarray 4x180KTM (Agilent Technologies) nach dem Protokoll des Herstellers. Jeweils 1 µl der Proben-DNA von CMT-93 und CT26.WT (separat, siehe Kapitel 3.1) und 1 µl Vergleichs-DNA (G3091, Promega) wurden durch Erhitzung auf 95 °C für 10 Minuten fragmentiert. Das Labeling erfolgte mit Cy3 (Vergleichs-DNA) bzw. Cy5 fluoreszierendem dUTP (Proben-DNA) unter Verwendung des SureTag DNA Labeling KitTM (Agilent Technologies). Nicht gebundene Nukleotide und Fluorochrome wurden entfernt. Proben- und Vergleichs-DNA wurden mit mouse Cot-1 DNATM (Invitrogen) auf den Array aufgetragen und bei 65 °C und Zentrifugieren bei 20 rpm für 24 Stunden hybridisiert. Die Arrays wurden gewaschen und mit einer Auflösung von 3 µm gescannt (Agilent Microarray Scanner System, Agilent Technologies). Die Bildverarbeitung erfolgte mit der Software Feature extraction[®] und Genomic Workbench 7.0[®] (Agilent Technologies) unter Nutzung des sogenannten ADM2-Aberrations-Algorithmus. Für die Auswertung wurden nur Imbalancen von größer als 3,5 Megabasenpaaren herangezogen (vergleiche Kapitel 5.1.3).

Die ermittelten Imbalancen wurden auf Übereinstimmung mit den Ergebnissen des mcb geprüft. Dies erfolgte durch Shaymaa S. Hussein Azawi am Institut für Humangenetik in Jena.

3.7 In-silico-Translation

Dieser Arbeitsschritt wurde durchgeführt von Shaymaa S. Hussein Azawi am Institut für Humangenetik in Jena. Alle in mcb und array-CGH gefundenen Imbalancen wurden den homologen Regionen im Humangenom zugeordnet durch Nutzung der Internet-Datenbank „Ensemble“ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/Synteny; abgerufen am 02.05.2017).

4 Ergebnisse

Für die folgende Darstellung wurde das International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN) in seiner gültigen Fassung von 2016 verwendet (McGowan-Jordan et al. 2016). Subklone wurden über zusätzliche (oder fehlende) Aberrationen definiert, die sich in mindestens 2 Metaphasen der mFISH-Analyse wiederfanden.

Soweit nicht anders angegeben, wurden für jede mFISH- und mcb-Analyse jeweils 30 nahe-diploide (CMT-93) bzw. nahe-triploide Metaphasen (CT26.WT) analysiert. Eine tabellarische Übersicht der mFISH-Ergebnisse sowie nichtklonale Aberrationen, die in den mFISH- und mcb-Analysen gefunden wurden, sind im Anhang in Tab. 8 bis Tab. 11 wiedergegeben.

4.1 CMT-93

4.1.1 Molekulare Zytogenetik

4.1.1.1 mFISH

Für CMT-93 wurde ein diploider Chromosomensatz mit triploiden Anteilen ermittelt. Er wird im Folgenden als nahe-diploid oder hyperdiploid bezeichnet. Zahlreiche Chromosomen liegen in variabler Kopiezahl vor. Die Chromosomenzahl beträgt 48 bis 56. CMT-93 zeigt eine Neigung zur Polyploidisierung, insbesondere zur Verdoppelung in einen nahe-tetraploiden Chromosomensatz, aber vereinzelt auch zu höheren Ploidiegraden (siehe Kapitel 4.1.1.2). Anhand der mikroskopischen Beobachtungen für mFISH und mcb kann der Anteil der Polyploidisierung auf etwa 6 bis 20 Prozent der Metaphasen geschätzt werden. Zur Vereinfachung der Ergebnisdarstellung wurden sowohl für die mFISH als auch das mcb mehr nahe-diploide als nahe-tetraploide Metaphasen ausgewertet. Für die mFISH wurden 4 nahe-tetraploide Metaphasen analysiert. Etwa 1 Prozent der mikroskopisch beobachteten Metaphasen zeigte einen komplett irregulären Karyotyp mit zahlreichen komplexen Aberrationen (Chromothripsis, siehe Kapitel 5.2.6) und wurde nicht zur Auswertung herangezogen. CMT-93 zeigt charakteristische Aberrationen für die Chromosomen 2, 5, 8 und X, anhand derer sich eine klonale Einteilung vornehmen lässt. Klon 1 und Klon 2 liegen mit nahezu gleicher Häufigkeit von etwa 50 Prozent vor, wobei sich Klon 2 in weitere Subklone unterteilen lässt.

Eine Deletion 8 konnte in zwei verschiedenen Formen, einer größeren und einer kleineren, festgestellt werden. Mithilfe von mcb 8 war es möglich, die zwei verschiedenen Bruchpunkte 8B1 und 8C2 zuzuordnen. Außerdem konnten durch mcb 2 und 8 die Deletionen 2 und 8 als Chromosomen mit Neozentromeren (vergleiche Kapitel 5.2.8) identifiziert werden.

Klon 1 (Abb. 7) fand sich in 16 von 30 Metaphasen. Davon zeigten 14 Metaphasen den folgenden nahe-diploiden Karyotyp:

48~56,XY,-Y[10],+neo(2),+3,+5,+6,+8[4],+neo(8)(:neo->B1->qter)[8],
+neo(8)(:neo->C2->qter)[9],+neo(8)(:neo->C2->qter)x2[5],+11[9],+12[6],+13[7],
idic(14;15)[13],+15,+17[8],+18[5],+19[3],+19x2[11],+mar[11]

2 Metaphasen zeigten einen nahe-tetraploiden Karyotyp (Chromosomenzahl 96~104).

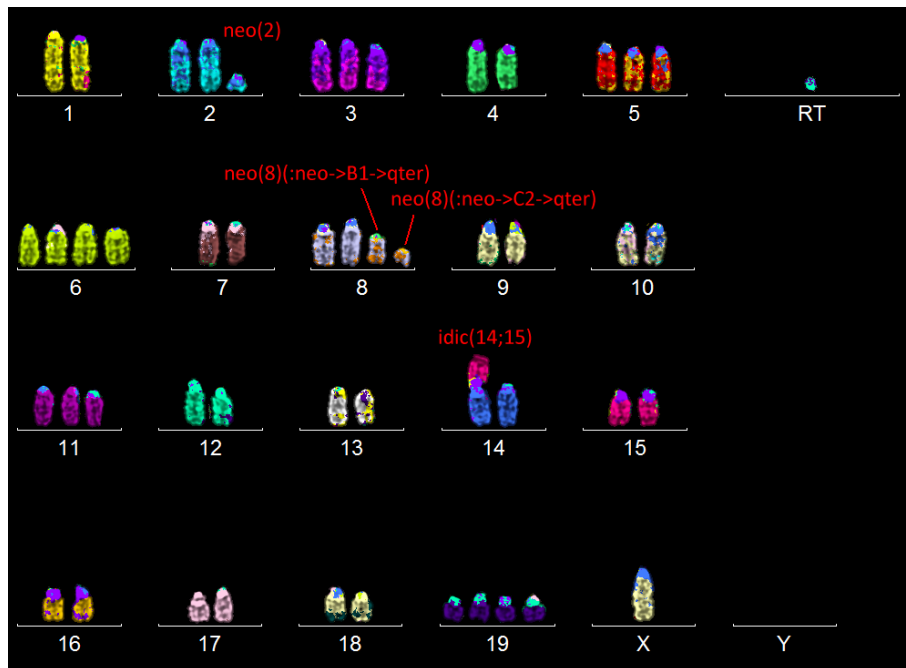


Abb. 7: Beispiel für ein mFISH-Karyogramm von CMT-93, Klon 1

Klon 2 (Abb. 8) zusammen mit seinen Subklonen 2a und 2b fand sich in 14 von 30 Metaphasen. Klon 2 selbst fand sich in 5 Metaphasen mit dem folgenden nahe-diploiden Karyotyp:

49~54,XY,+X[4],-Y[2],+neo(2),+3[3],+5,+6,+8[3],+der(8)t(2;8),+neo(8)(:neo->C2->qter),+11[3],
+13[3],idic(14;15)[2],+15,+17[2],+19,+mar[3]

Nur nahe-diploide Metaphasen wurden analysiert. Jedoch zeigen mcb 2 und mcb 8, dass auch dieser Klon eine Neigung zur Polyploidisierung aufweist.

Subklon 2a fand sich in 2 von 30 Metaphasen. Er zeigt denselben nahe-diploiden Karyotyp wie Klon 2, aber mit folgenden Abweichungen: -2, +der(2)t(2;5), +del(5)

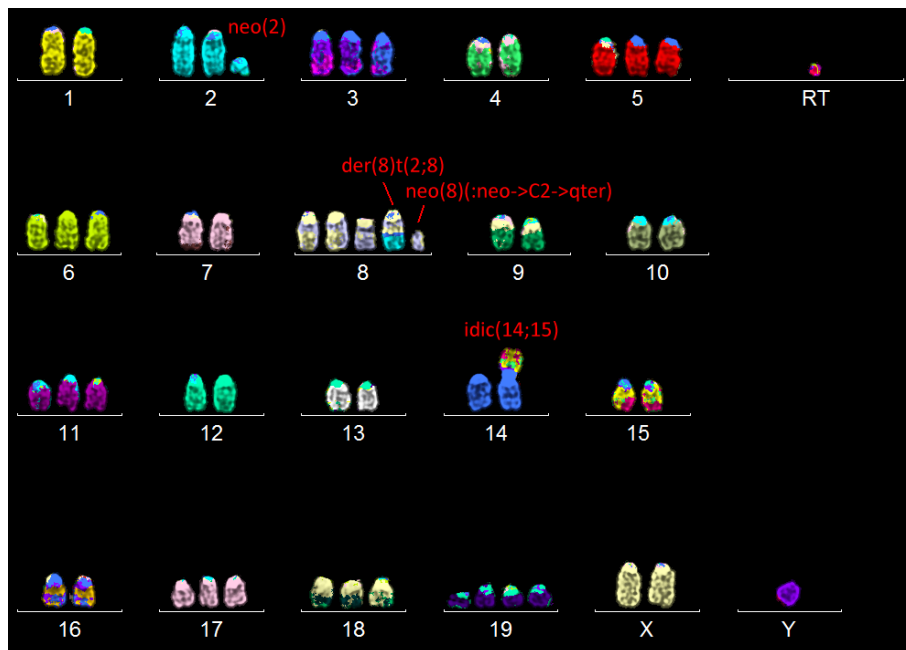


Abb. 8: Beispiel für ein mFISH-Karyogramm von CMT-93, Klon 2

Subklon 2b fand sich in 7 von 30 Metaphasen. Er zeigt denselben nahe-diploiden Karyotyp wie Klon 2, jedoch mit dem Unterschied eines längeren X-Chromosoms. Durch mcb X konnte diese Aberration als ein Derivatvchromosom X identifiziert werden.

5 Metaphasen wiesen den folgenden nahe-diploiden Karyotyp auf:

51~53,XY,der(X),-Y[3],+neo(2),+3,+5,+6,+8,+der(8)t(2;8),+neo(8)(:C2->qter),+11,+12,+13[3], idic(14;15),+15,+17,+19,+mar[3]

2 analysierte Metaphasen waren nahe-tetraploid (Chromosomenzahl 102~107).

4.1.1.2 mcb

Erläuterung der Abbildungen: Auf den folgenden Abbildungen werden die wichtigsten im mcb gefundenen Aberrationen dargestellt. Jeweils oben links findet sich ein Ausschnitt des Karyogramms, welcher alle Chromosomen enthält, die Banden des jeweiligen mcb aufweisen. Im unteren Teil erhält jedes dieser Chromosomen seine aufgeschlüsselte Bandendarstellung, von links nach rechts:

- die einander überlagernden Banden in Falschfarben (Chromosomenabschnitte, die keine oder nicht relevante Signale abgeben, wurden mit grauen Farbton markiert);
- die nach fünf verschiedenen Fluorochromen getrennten mcb-Banden (vergleiche Abb. 6 auf Seite 25);
- ein Diagramm der sich überlagernden Signalintensitäten entlang des Chromosoms;
- die invertierte Darstellung der DAPI-Bänderung.

mcb 1: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 26 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 4 nahe-tetraploiden Metaphasen.

mcb 2: Übereinstimmend mit Klon 1 fanden sich zwei normale Chromosomen und ein neo(2)(:neo->F3->qter) in 8 Metaphasen (Abb. 9) und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-tetraploiden Metaphase.

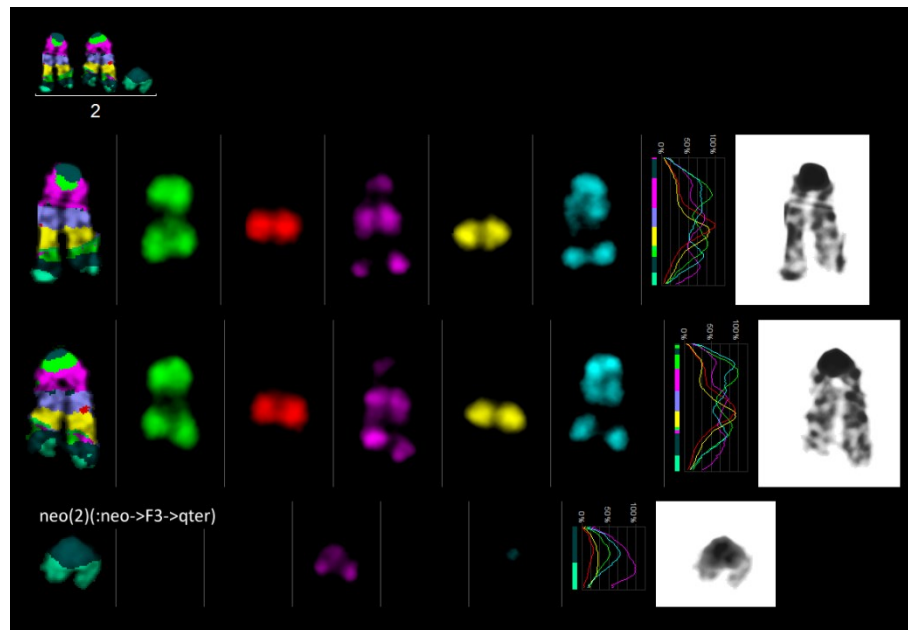


Abb. 9: CMT-93, mcb 2, Klon 1

Übereinstimmend mit Klon 2 und Subklon 2b fanden sich zwei normale Chromosomen, ein neo(2)(:neo->F3->qter) und ein der(8)t(2;8)(8A1->8A4~8B1::2E2->2qter) in 14 Metaphasen (Abb. 10) und die doppelte Kopiezahl in 5 nahe-tetraploiden Metaphasen.

Übereinstimmend mit Subklon 2a fanden sich ein normales Chromosom, ein der(2)t(2;5)(2A1->2C3::5E3->5qter), ein neo(2)(:neo->F3->qter) und ein der(8)t(2;8)(8A1->8A4~8B1::2E2->2qter) in 2 Metaphasen (Abb. 11).

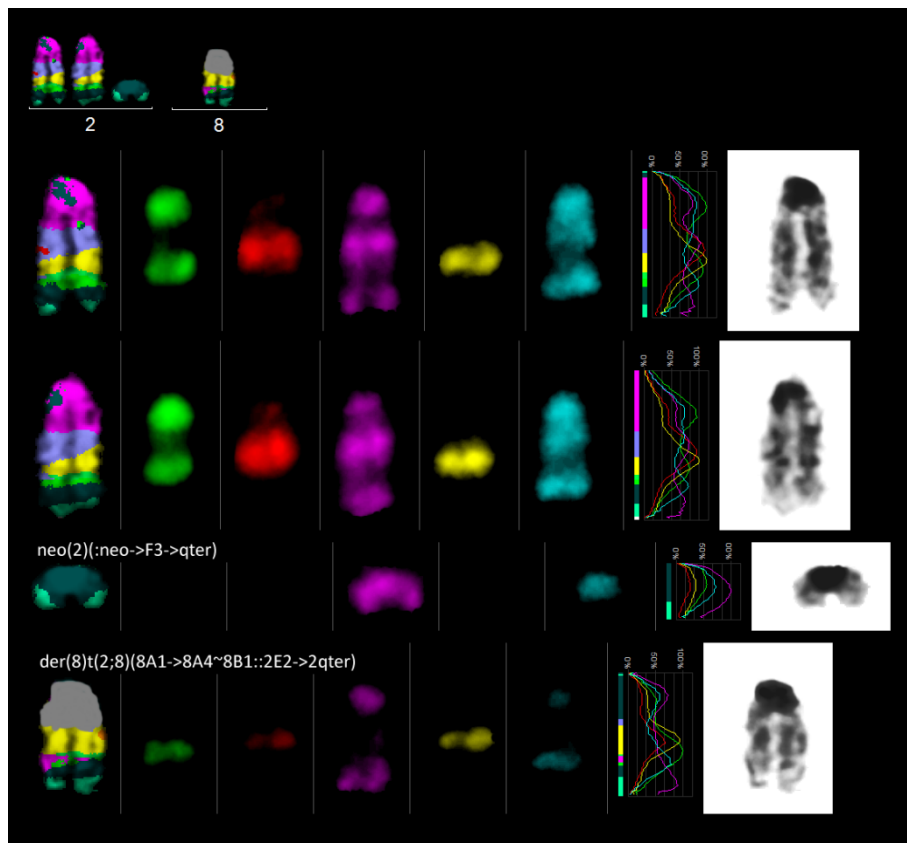


Abb. 10: CMT-93, mcb 2, Klon 2 und Subklon 2b

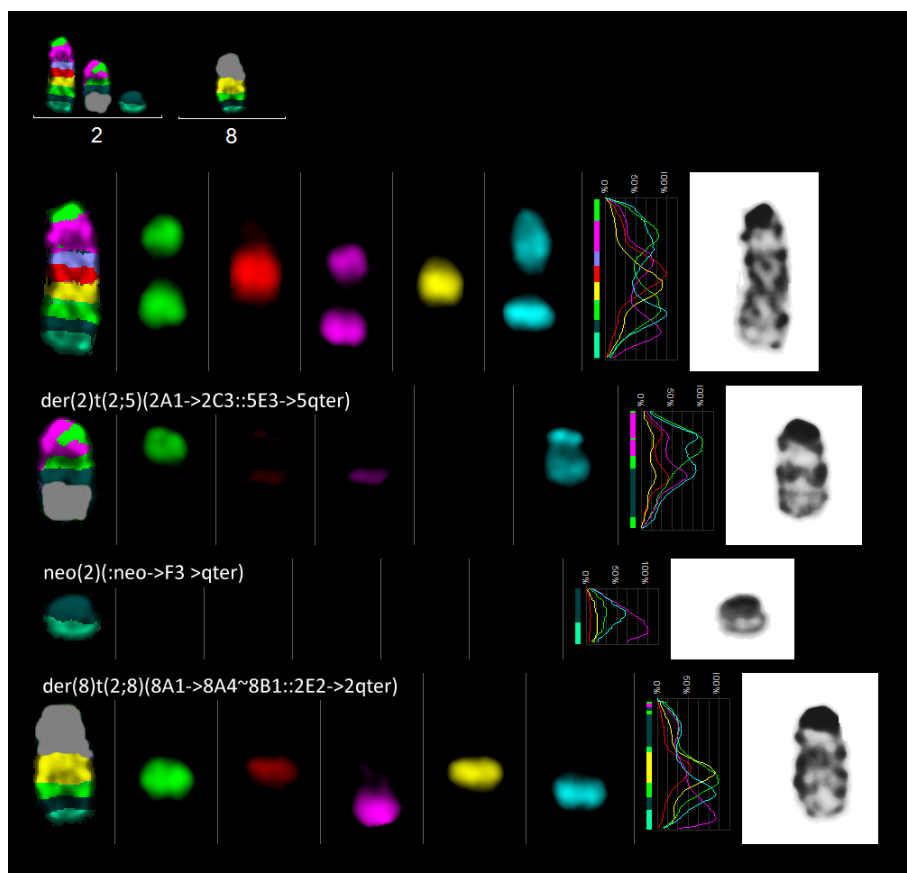


Abb. 11: CMT-93, mcb 2, Subklon 2a

mcb 3: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 2 Metaphasen. Drei normale Chromosomen fanden sich in 21 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 6 nahe-tetraploiden Metaphasen. Eine nichtklonale Aberration lag einmal vor.

mcb 4: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 18 Metaphasen, die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-tetraploiden Metaphasen und die vierfache Kopiezahl in 1 nahe-octaploiden Metaphase. Eine nichtklonale Aberration lag einmal vor.

Zwei normale Chromosomen und ein neo(4)(:C6?->C7?:) fanden sich in 4 Metaphasen; zwei normale Chromosomen und zwei neo(4) in 2 Metaphasen; drei normale Chromosomen und ein neo(4) in 1 Metaphase sowie sechs normale Chromosomen, ein neo(4) und ein der(?)t(?;4)(?:4C6?->4C7?:?) in 1 höher ploidien Metaphase. Diese Aberration könnte das in der mFISH gefundene Markerchromosom repräsentieren.

mcb 5: Drei normale Chromosomen fanden sich in 21 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-tetraploiden Metaphasen; vier normale Chromosomen in 2 Metaphasen. Einmal lagen nichtklonale Aberrationen vor.

Übereinstimmend mit Subklon 2a fanden sich ein normales Chromosom, eine del(5)(A1->E2:) und ein der(2)t(2;5)(2A1->2C3::5E3->5qter) in 3 Metaphasen (Abb. 12).

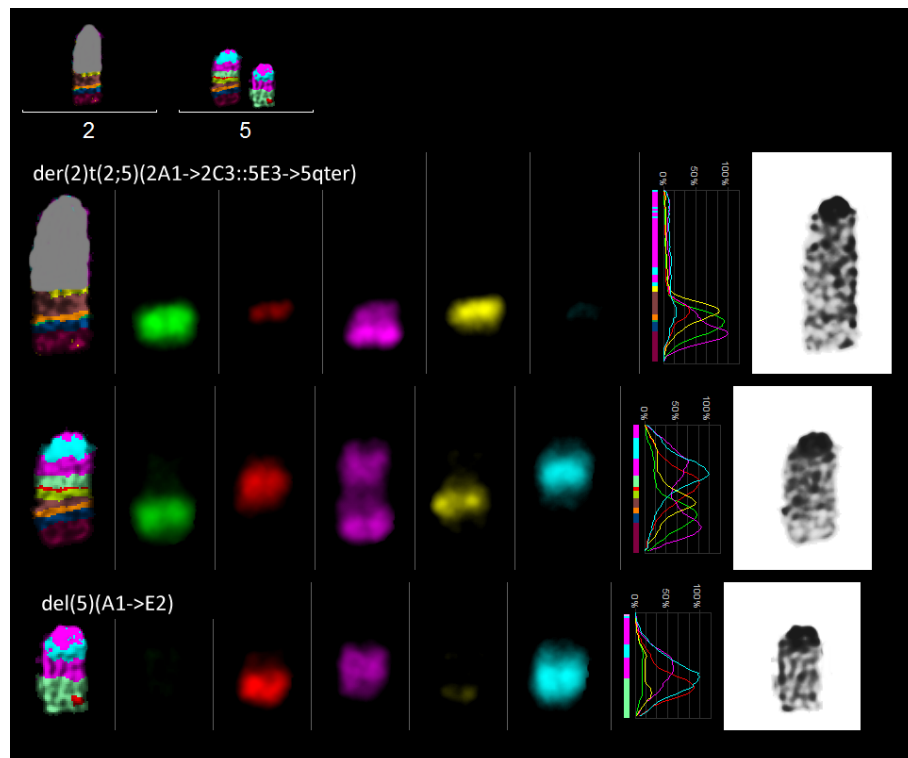


Abb. 12: CMT-93, mcb 5, Subklon 2a

mcb 6: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 2 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-tetraploiden Metaphase; drei normale Chromosomen in 21 Metaphasen, die doppelte Kopiezahl in 5 nahe-tetraploiden Metaphasen und die vierfache Kopiezahl in 1 nahe-octaploiden Metaphase.

mcb 7: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 24 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 4 nahe-tetraploiden Metaphasen. Zweimal lagen nichtklonale Aberrationen vor.

mcb 8: Übereinstimmend mit Klon 1 fanden sich zwei normale Chromosomen, ein der(8)(A1->D1::D1->C2) und ein neo(8)(:neo->C2->qter) in 5 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-tetraploiden Metaphase; ein normales Chromosom, ein der(8)(A1->D1::D1->C2), ein neo(8)(:neo->B1->qter) und ein neo(8)(:neo->C2->qter) in 6 Metaphasen (Abb. 13) und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-tetraploiden Metaphase.

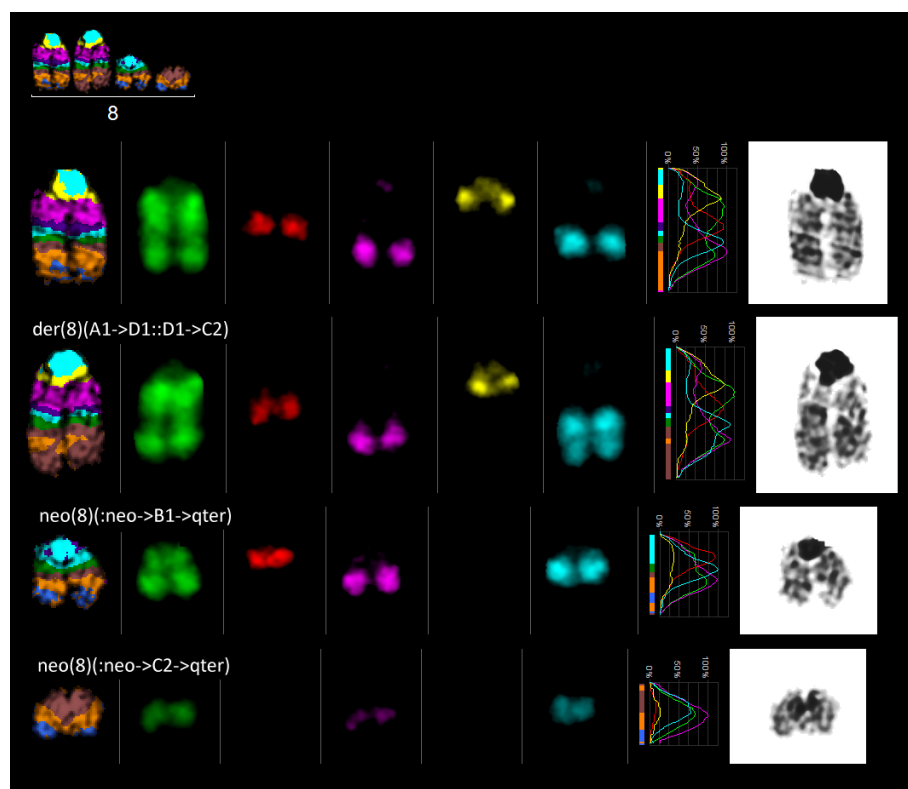


Abb. 13: CMT-93, mcb 8, Klon 1

Übereinstimmend mit Klon 2 und seinen Subklonen fanden sich zwei normale Chromosomen, ein der(8)(A1->D1::D1->C2), ein der(8)t(2;8)(8A1->8A4~8B1::2E2->2qter) und ein neo(8)(:neo->C2->qter) in 10 Metaphasen (Abb. 14) und die doppelte Kopiezahl in 5 nahe-tetraploiden Metaphasen. Die gleiche Konstellation, aber mit dreimaliger neo(8) fand sich einmal.

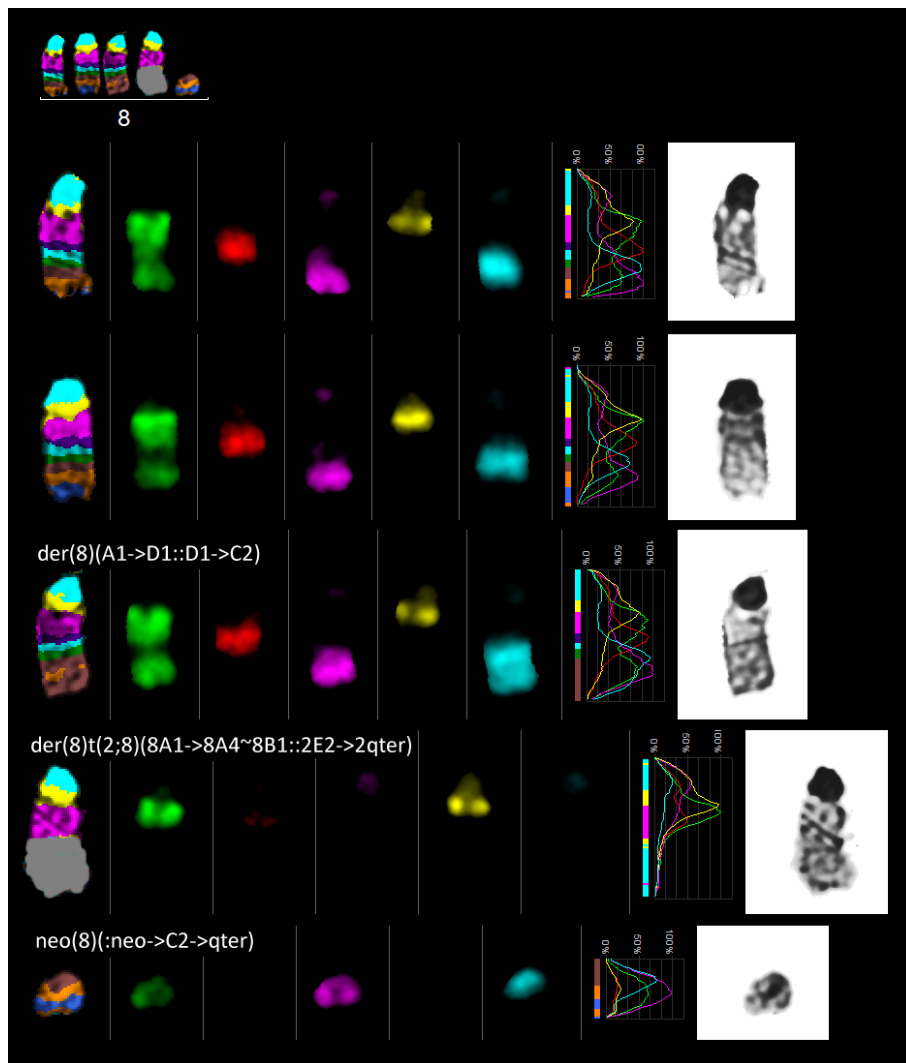


Abb. 14: CMT-93, mcb 8, Klon 2 mit seinen Subklonen

mcb 9: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 26 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 4 nahe-tetraploiden Metaphasen.

mcb 10: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 27 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 3 nahe-tetraploiden Metaphasen.

mcb 11: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 4 Metaphasen; drei normale Chromosomen in 20 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 5 nahe-tetraploiden Metaphasen. Einmal lagen nichtklonale Aberrationen vor.

mcb 12: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 3 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 3 nahe-tetraploiden Metaphasen; drei normale Chromosomen in 11 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 3 nahe-tetraploiden Metaphasen.

mcb 13: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 23 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-tetraploiden Metaphasen; drei normale Chromosomen in 2 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 3 nahe-tetraploiden Metaphasen.

mcb 14: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 9 Metaphasen; 1 normales Chromosom und ein idic(14;15) in 18 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 3 nahe-tetraploiden Metaphasen.

mcb 15: Drei normale Chromosomen fanden sich in 4 Metaphasen; 1 normales Chromosom und ein idic(14;15) in 18 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 3 nahe-tetraploiden Metaphasen. Nichtklonale Aberrationen lagen in 6 Metaphasen vor.

mcb 16: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 16 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 10 nahe-tetraploiden Metaphasen; drei normale Chromosomen in 2 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-tetraploiden Metaphase. Einmal lagen nichtklonale Aberrationen vor.

mcb 17: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 5 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-tetraploiden Metaphasen; drei normale Chromosomen in 20 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-tetraploiden Metaphase. Nichtklonale Aberrationen lagen in 3 Metaphasen vor.

mcb 18: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 25 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 5 nahe-tetraploiden Metaphasen.

mcb 19: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 1 Metaphase; drei normale Chromosomen in 14 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-tetraploiden Metaphasen; vier normale Chromosomen in 10 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-tetraploiden Metaphasen. Einmal lag eine nichtklonale Aberration vor.

mcb X: Ein normales Chromosom fand sich in 15 Metaphasen; zwei normale Chromosomen in 3 nahe-diploiden Metaphasen mit einer unterschiedlichen Länge der Zentromere. Ebenso fanden sich zwei normale Chromosomen in 2 nahe-tetraploiden Metaphasen. In 1 Metaphase lag eine nichtklonale Aberration vor.

Übereinstimmend mit Subklon 2b fand sich ein der(X)(A1->qter::A3->qter) in 6 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-tetraploiden Metaphasen (Abb. 15).

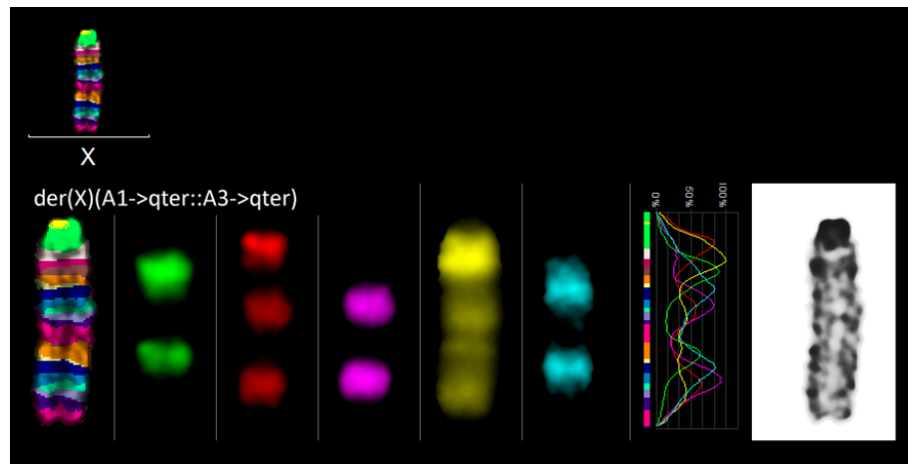


Abb. 15: CMT-93, mcb X, Subklon 2b

mcb Y: Ein solches mcb steht nicht zur Verfügung, vergleiche Kapitel 5.1.2. In der mFISH fand sich ein morphologisch unauffälliges Y-Chromosom, das aber in vielen Metaphasen fehlte.

4.1.2 array-CGH und in-silico-Translation

Tab. 3, Abb. 16 und Abb. 17 enthalten die Ergebnisse der array-CGH und der in-silico-Translation. Die Ergebnisse der array-CGH stimmten mit den Ergebnissen der molekularen Zytogenetik weitgehend überein (Näheres siehe Kapitel 5.1.2 und 5.1.3).

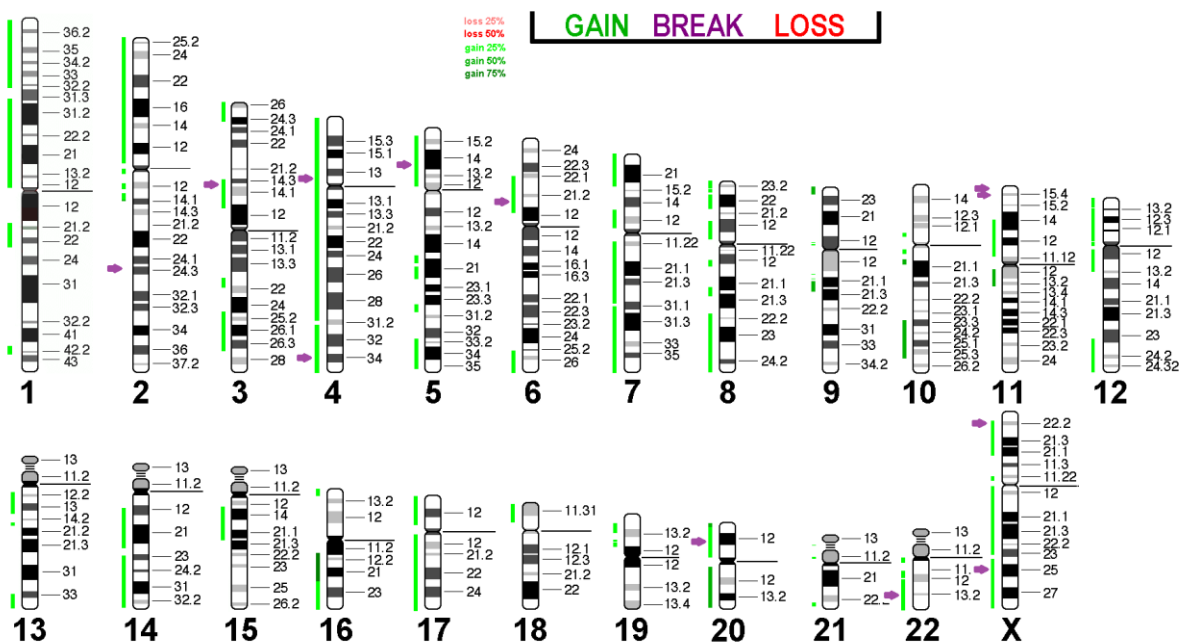
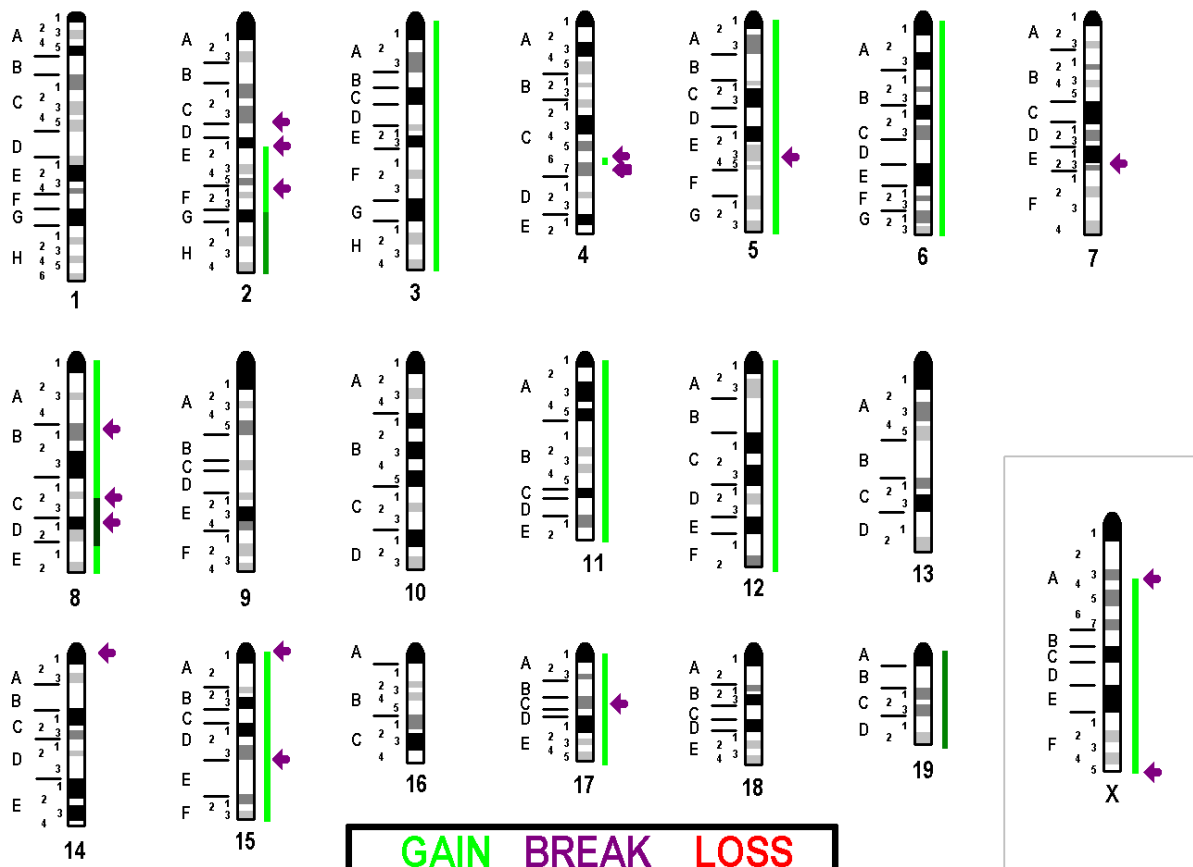
Tab. 3: Ergebnisse der array-CGH und der in-silico-Translation, getrennt nach Zugewinnen, Verlusten und Bruchpunkten. Einbezogen wurden auch nichtklonale Aberrationen aus mcb 15 und 17.

| Region | Zugewinn | Homologe Region im Humangenom | |
|------------|----------|-------------------------------|------------------------|
| | | Zytobande | Position (GRCh37/hg19) |
| 2qE1 – qG2 | x1 | 11p11.2-p14.2 | 11:26188819-48637160 |
| | | 20p11.21-p13 | 20:1755455-25625984 |
| | | 2p11.2 | 2:87118510-87696552 |
| | | 2q13.3-q14.1 | 2:110637663-112892430 |
| | | 2q11.1-q11.2 | 2:94976532-96374879 |
| | | 15q13.3-q21.2 | 15:32614079-51005976 |
| 2qG2 - qH4 | x2 | 20q13.32-q13.33 | 20:59573167-64276082 |
| | | 20p11.21-p13.32 | 20:31301793-59481159 |
| | | 20p13 | 20:142056-1467297 |
| 3qA1 - qH4 | x1 | 13q13.2-q14.11 | 13:33906643-40680076 |
| | | 3q24-q25.1 | 3:148749748-149247516 |
| | | 3q26.2-q27.1 | 3:168139317-183100677 |
| | | 3q25.1-q26.2 | 3:149338029-168104318 |
| | | 7q11.23 | 7:76653413-76946262 |
| | | 9p11.2-p12 | 9:39883273-40101748 |
| | | 9p11.2 | 9:41363764-41621239 |
| | | 9q21.11 | 9:66274930-66379174 |
| | | 9q13 | 9:63544183-63698999 |

| | | | |
|------------|----|--|--|
| | | 1p22.2-p31.3 1p11.2-p22.1 1q21.1 1q21.1-q23.1 21p11.2 4q22.3-q27 4q27-q31.1 4q31.3-q32.2 4 q32.2 8q12.3-q22.1 8q21.13-q21.3 | 1:68121446-89272452 1:93439600-120801119 1:145600873-146297768 1:147100246-158184951 21:9860388-10114639 4:94363548-119782165 4:121305166-140269076 4:150045231-160313119 4:160328589-162175360 8:63163338-66403590 8:75285702-86044133 |
| 4qC6 - qC7 | x1 | 1p32.1-p36.33 | 1:933238-58547094 |
| 5qA1 - qG3 | x1 | 12q23.3-q24.11 12q2.11-q24.31 12q24.31-q24.33 12 q24.33 18p11.32 22q11.23-q12.1 22q12.2-q12.3 7p22.1-p22.3 7p15.3 7p11.2 7q11.21-q11.23 7 q11.23 7 q11.23-q21.2 7q21.3-q22.1 7q22.1 7q22.1-q22.3 7q36.1 7q36.1-q36.3 1p22.1-p22.2 13q12.13-q14.11 2q23.2-q23.3 4p16.3 4p16.3 4p16.3-q22.1 | 12:107931580-110048615 12:110050988-121059734 12:121109639-131852016 12:131894446-132945956 18:683166-844067 22:24805798-28760295 22:31626131-32115679 7:115497-6732018 7:22562781-22733045 7:55951659-56116445 7:67371788-72722850 7:73145680-76520510 7:77072929-93047200 7:97968996-99631744 7:99955218-102551307 7:102691476-105569647 7:149931563-150262684 7:150896031-157417511 1:89498675-93369782 13:26210757-33680968 2:26171597-28801596 4:1115354-3874051 4:559243-1058871 4:4183016-88079035 |
| 6qA1 - qG3 | x1 | 1p31.3 2p13.3 2p11.2-p13.3 2p11.2 3p25.2-ptr 3p25.2 3p25.1-p25.2 3p12.3-p14.1 3q21.3 3q22.1 7p21.3-p22.1 7p11.2 7q21.2-q21.3 7q31.1-q32.1 7q32.1-q36.1 7q36.1 10q11.21-q11.22 12p13.33 12p13.31 12p13.31-p13.33 12p11.21-p13.31 22q11.1-q11.21 4q22.1-q22.3 4q27 | 1:67166227-67851415 2:68487905-70797831 2:70805311-86867996 2:88002903-88874857 3:12360-12059043 3:12075139-12855873 3:12897779-15118656 3:64032928-75273450 3:126006258-129319641 3:129376089-129895684 7:7093365-12492920 7:55364682-55573516 7:93101327-97872805 7:112498864-128461586 7:128671928-149886174 7:150335378-150863779 10:42782538-45674259 12:12900-2743910 12:7905547-9061868 12:2793954-7543294 12:9748769-32384500 22:17084921-18176973 4:88257546-94351949 4:120041924-121273532 |

| | | | |
|---------------|----|--|---|
| 8qA1-qC2 | x1 | 19p13.2 13q33.1-qtr 8p23,2-p23.3 8p23.1-p23,2 8p23,2 13q14.3 8p11.21-p11.23 8p11.23-p12 8p23.1 8p22.3- p23.1 4q32.2-qtr 8p21.3-p22 19q13.11-q13.12 22q12.3 | 19:7112172-8069598 13:102881565-114327455 8:397986-5501230 8:5904979-6718069 8:5510625-5890510 13:51812906-52637583 8:36859024-42639769 8:29332949-36820056 8:8251254-9782907 8:12721564-18101445 4:162582872-189963502 8:18135309-20320465 19:16052230-19664128 22:33262346-35459147 |
| 8qC2 - qD3 | x3 | 16q12.1-q22.1 | 16:46659361-69942202 |
| 8D3-qtr | x1 | 22q22.1-q23.1 10p11.21-pp11.22 1q42.13-q42.3 16q23.1-qtr 16q22.1-q23.1 1q21.1 | 22:33262346-35459147 10:32752983-34863341 1:229229193-235161459 16:74408145-90043622 16:70075624-74311815 1:146542324-146899900 |
| 11 qA1 – qE2 | x1 | 1q42.13 17p13.2-p13.3 17p12-p13.2 17p11.2-p12 17p11.2 17q11.1-q11.2 17q11.2-q12 17q12-q21.31 17q21.31- q21.32 17q21.32-q23.2 17q23.2-q24.1 17 q24.1- q24.2 17q24.2-qtr 22q12.1-q12.2 7p12.1-p12.3 7p12.1-p11.2 7q32.1 16p13.3-ptr 2p13.3-p16.2 5q23.3-q31.1 5q33.1-q33.2 5q33.2-q35.1 5q35.2 5q35.3 | 1:227732052-228515511 17:143647-4628746 17:4630159-15722490 17:15828287-16569637 17:17013944-21429010 17:27198624-30526883 17:30731359-37831987 17:38195870-45561456 17:45629380-47073225 17:47482968-62248837 17:62298466-64764269 17:64952801-68114549 17:68228066-83227287 22:28772603-31626130 7:43924481-53156756 7:53191518-55250238 7:128466497-128616266 16:28819-173821 2:53660668-68467594 5:131159221-134727937 5:151002149-154951429 5:154952277-172505309 5:173309722-174284250 5:178104362-180869289 |
| 12qA1.1 - qF2 | x1 | 2p23.3-p25.1 2p25.1 2p25.1-ptr 2q11.1 7q22.3-q31.1 7p21.1-p21.3 7 q31.1 14q12-q22.1 14q23.1-32.33 7q36.3 7p15.3-21.1 | 2:10162883-26139074 2:9214594-10144790 2:172258-9138189 2:94607466-94720140 7:105569791-108131740 7:12522126-19709187 7:12522126-19709187 14:24687986-51784456 14:58199894-105939623 7:157432951-159145209 7:19713790-22489274 |
| 15qA1 - qF3 | x1 | 12q12-q13.2 12p11.1 22q13.3-qtr | 12:38213339-54655672 12:33053427-34105230 22:35566904-50784010 |

| | | 8q24.23-q24.3 8q22.1-q24.23 5p12-p15.31 | 8:136870681-144619253 8:96434404-136853592 5:8927633-42888873 |
|----------------------|----------------------------------|---|--|
| 17qA1 - qE5 | x1 | 16p13.3 19p13.2-p13.3 19p13.2 19p13.12 21q11.1 21q22.3 5q15-q21.1 5q21.2-q22.1 5q35.1 18p11.32 18p11.22-p11.32 2p16.2-p23.2 2q12.3 3p24.3 6q25.2-q25.3 6 q25.3-q27 6 q27 6p21.2-p21.32 6 p21.32-p22.1 6p12.3-p21.2 | 16:176594-3184624 19:4229085-6940562 19:8301803-8698881 19:15159485-15697397 21:6006586-6141527 21:42070393-43703062 5:96866613-99069535 5:103423614-110727320 5:172519748-173295346 18:861721-2534401 18:2534402-9972544 2:28810654-53031720 2:106767529-108195055 3:16266324-20190407 6:154731949-159680614 6:159682000-167138582 6:167442131-170584666 6:33500959-39090282 6:29393610-33329441 6:39298722-49714113 |
| 19qA - qD3 | x2 | 10q22.1-q26.11 10q11.23-q21.1 2q14.1 9p24.1-ptr 9q21.11-q21.31 11q12.1-q13.3 | 10:87474356-119459995 10:50157843-52780322 2:113413562-113564048 9:51702-6659223 9:68221841-80162449 11:58108647-68942254 |
| XqA4 - qF5 | x1 | Xq24-q25 Xq25-q28 Xp22.2-p22.31 Xp21.1-p22.11 Xq11.1-q21.32 Xq21.32-q23 Xp22.2 Xp11.21-11.22 Xp22.11-p22.2 Xp23 | X:118452702-127335026 X:127404034-155264946 X:8818929-9719766 X:23832192-37457604 X:63633840-94173088 X:94193017-115283323 X:9720195-9949488 X:52958297-56292129 X:10447551-23831475 X:115335039-115651225 |
| Bruchpunkt Region | Bruchpunkt Art (* balanciert) | Homologe Region im Humangenom | |
| | | Zytobande | Position (GRCh37/hg19) |
| 2qC3 | Translokation | 2q24.3 | 2:163093397-164093396 |
| 2qE1 | Translokation | 11p15.5 | 11:1-500000 |
| 2qG2 | Translokation | 20p12.1 | 20:12721772-13721771 |
| 4qC6 | Translokation | 1p31.3 | 1:61936298-62936297 |
| 4qC7 | Translokation | 1p35.3 | 1:28736517-29736516 |
| 5qE3 | Translokation* | 4p12 | 4:45535770-46535769 |
| 7qE1 | Translokation* | 11p15.4 | 11:9278668-10278667 |
| 8qB1.1 | Translokation | 4q34.2 | 4:175132935-176132934 |
| 8qC2 | Translokation | 19p13.13 | 19:12599034-13599033 |
| 8qD1 | Translokation | 16q21 | 16:57258218-58258217 |
| 8qD3 | Translokation | 16q22.1 | 16:71137836-72137835 |
| 14qA1 | isozidentrisch | 3p14.2 | 3:59249311-60249310 |
| 15qA1 | isodizentrisch | 5p14.1 | 5:25083020-26083019 |
| 15qE1 | Translokation* | 22q13.2 | 22:42192122-43192121 |
| 17qC | Translokation* | 6p21.1 | 6:43613455-44613454 |
| XqA3 | Duplikation | Xq25 | X:122684154-123684153 |
| XqF5 | Duplikation | Xp22.2 | X:16088004-17088003 |



4.1.3 Zusammengesetzter Karyotyp

Aus den Ergebnissen von mFISH, mcb und array-CGH konnte folgender zusammengesetzter Karyotyp ermittelt werden (verkürzte Schreibweise nach ISCN):

Klon 1: 48~56,XY,-Y[10],+neo(2)(:neo->G2->qter),+3,+neo(4)(:C6->C7:)[11],+5,+6,der(8)(A1->D1::D1->C2),+8[4],+neo(8)(:neo->B1.1->qter)[8],+neo(8)(:neo->C2->qter)[9],+neo(8)(:neo->C2->qter)x2[5],+11[9],+12[6],+13[7],idic(14;15)[13],+15,+17[8],+18[5],+19[3],+19x2[11] [cp14] / 96~104,idem x 2 [cp2]

Klon 2: 49~54,XY,+X[4],-Y[2],+neo(2)(:neo->G2->qter),+3[3],+neo(4)(:C6->C7:)[2],+5[4],+6[4],der(8)(A1->D1::D1->C2),+8[3],+der(8)t(2;8)(B1.1;E1),+neo(8)(:neo->C2->qter),+11[3],+13[3],idic(14;15)[2], +15,+17[2],+19 [cp5]

- **Subklon 2a:** 53~54,idem,-2,+der(2)t(2;5)(C3;E3),+del(5)(E2) [cp2]

- **Subklon 2b:** 51~53,idem,der(X)(A1->F5::A3->qter),+12 [cp5] / 102~107,idem x 2 [cp2]

4.2 CT26.WT

4.2.1 Molekulare Zytogenetik

4.2.1.1 mFISH

Für CT26.WT wurde ein triploider Chromosomensatz mit tetraploiden Anteilen ermittelt. Er wird im Folgenden als nahe-triploid oder hypertriploid bezeichnet. Zahlreiche Chromosomen liegen in variabler Kopiezahl vor. Diese Variabilität ist noch höher als für CMT-93. Die Chromosomenzahl beträgt 57 bis 64.

CT26.WT zeigt ebenfalls eine Neigung zur Polyploidisierung, insbesondere zur Verdoppelung in einen nahe-hexaploiden Chromosomensatz, aber vereinzelt auch zu höheren Ploidiegraden (siehe Kapitel 4.2.1.2). Anhand der mikroskopischen Beobachtungen für mFISH und mcb kann der Anteil der Polyploidisierung auf etwa 20 bis 30 Prozent der Metaphasen geschätzt werden. Zur Vereinfachung der Ergebnisdarstellung wurden sowohl für die mFISH als auch das mcb mehr nahe-triploide als nahe-hexaploide Metaphasen ausgewertet. Für die mFISH wurden 3 nahe-hexaploide Metaphasen analysiert.

Metaphasen mit Chromothripsis wurden nicht gefunden. Jedoch wiesen bis zu 5 Prozent der mikroskopisch beobachteten Metaphasen einen offensichtlich irregulären Chromosomensatz durch Vervielfältigung oder Verlust mehrerer Chromosomen auf. Diese Metaphasen wurden nur in Einzelfällen für die mcb-Analyse herangezogen.

Bedingt durch die hohe Variabilität der Kopiezahlen gestaltet sich die Identifizierung von Klonen weniger eindeutig als für CMT-93. Die im Folgenden vorgenommene Unterteilung in Klone und Subklone stellt nur eine von mehreren Möglichkeiten dar (vergleiche Kapitel 5.2.2).

Klon 1 zusammen mit seinen Subklonen fand sich in 12 von 30 Metaphasen und wird charakterisiert durch zwei normale X-Chromosomen.

Klon 1 an sich fand sich in 4 Metaphasen mit dem folgenden nahe-triploiden Karyotyp:

59~61,XX,idic(1;14),+1x2,+2,+der(2)t(2;9),+der(3)t(3;15),+4,idic(5;15),idic(5;19),+5,+idic(5),idic(6),+6,+der(6)t(3;6;10),+7,+der(7)t(7;19),+8x2,+der(9)t(2;9),+10,+11,idic(12),+12,idic(13),idic(13;17),+13,+neo(13),idic(14),+14,+15,+16,+17x2,+18,+19x2,+marx2[2]

Subklon 1a (Abb. 18): Subklon 1a fand sich in 8 von 30 Metaphasen. Davon zeigten 5 Metaphasen zeigten den nahe-triploiden Karyotyp von Klon 1 mit folgenden Abweichungen:

+dup(18),+19,+marx2[2],+marx3[2]

3 Metaphasen zeigten einen nahe-hexaploiden Karyotyp (Chromosomenzahl 118~121).

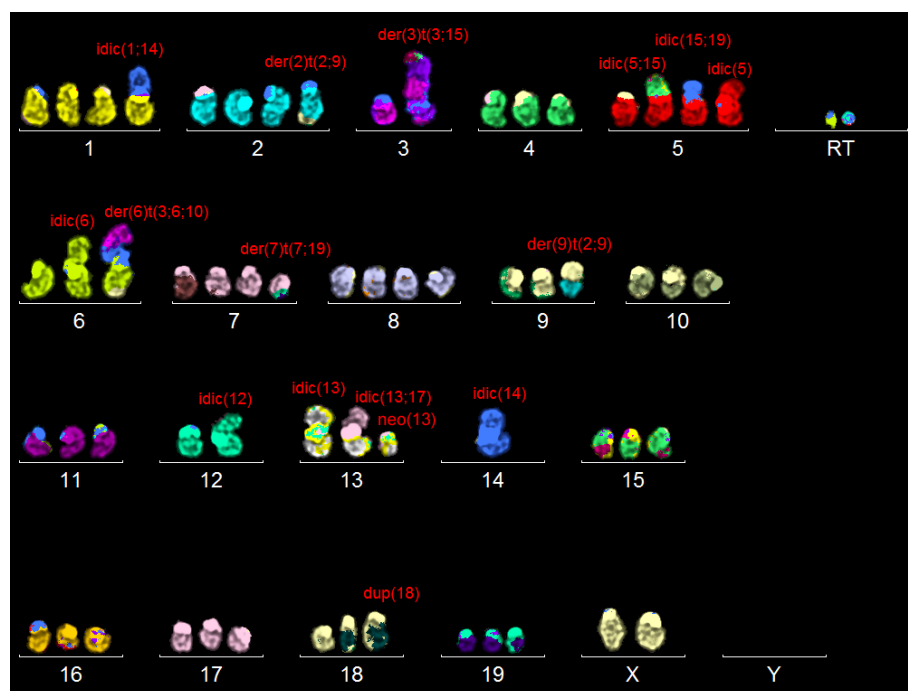


Abb. 18: Beispiel für ein mFISH-Karyogramm von CMT-93, Subklon 1a

Klon 2 zusammen mit seinen Subklonen fand sich in 18 von 30 Metaphasen. Er wird charakterisiert durch ein normales X-Chromosom und ein isodizentrisches Chromosom (12;X), welches in der mcb-Analyse eine Deletion auf Chromosom X zeigte.

Klon 2 an sich fand sich in 6 Metaphasen mit dem folgenden nahe-triploiden Karyotyp:

59~64,XX,idic(1;14),+1x2,+2,+der(2)t(2;9),+der(3)t(3;15),+4,idic(5;15),idic(5;19),+5,+idic(5),idic(6),+6,+der(6)t(3;6;10),+7,+der(7)t(7;19),+8x2,+der(9)t(2;9),+10,+11,idic(12),idic(12;X),+12,idic(13),idic(13;17),+13,+neo(13),idic(14),+14,+15x2,+16,+17x2,+18,+19x2

Alle Subklone zeigten denselben Karyotyp, mit Ausnahme der unten aufgeführten Abweichungen.

Subklon 2a wird charakterisiert durch den Verlust von idic(1;14) und fand sich in 2 Metaphasen.

Subklon 2b wird charakterisiert durch den Verlust von idic(5;15) und fand sich in 2 Metaphasen.

Subklon 2c wird charakterisiert durch den Verlust von der(3)t(3;15) und fand sich in 3 Metaphasen.

Subklon 2d (Abb. 19) wird charakterisiert durch ein der(6)t(6;10) anstelle des der(6)t(3;6;10) und fand sich in 3 Metaphasen.

Subklon 2e wird charakterisiert durch eine dup(18) und fand sich in 2 Metaphasen.

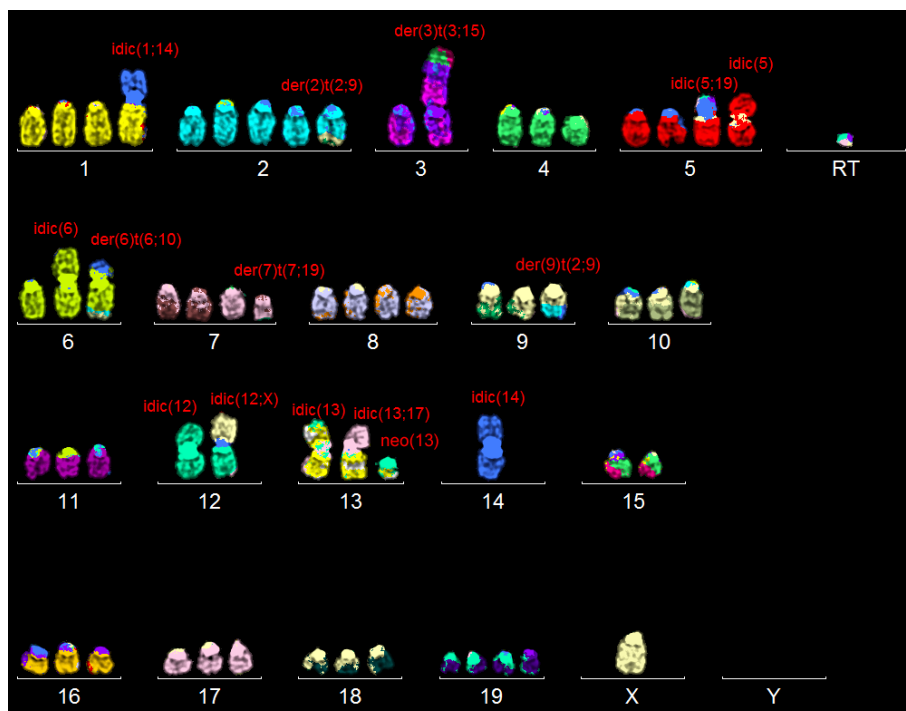
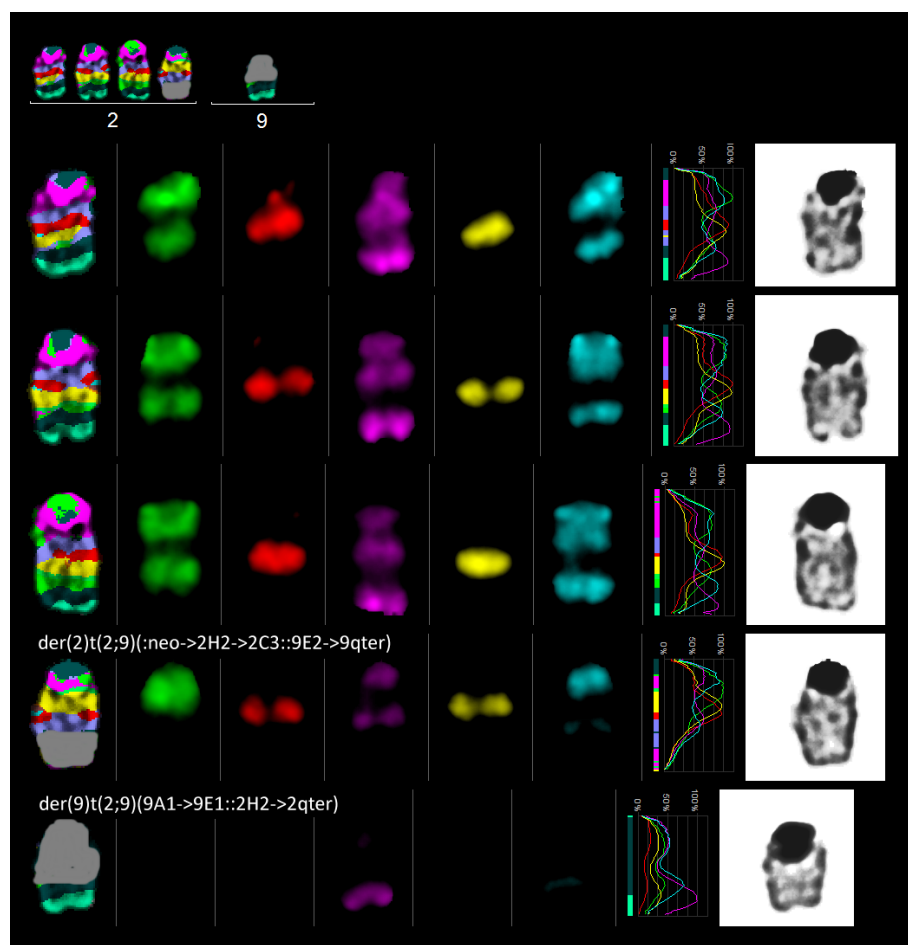


Abb. 19: Beispiel für ein mFISH-Karyogramm von CMT-93, Subklon 2d

Erläuterung der Abbildungen: siehe Kapitel 4.1.1.2

mcb 2: Zwei normale Chromosomen, ein der(2)t(2;9)(:neo->2H2->2C3::9E2->9qter) und ein der(9)t(2;9)(9A1->9E1::2H2->2qter) fanden sich in 7 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-hexaploiden Metaphasen; drei normale Chromosomen, ein der(2) und ein der(9) in 15 Metaphasen (Abb. 20) und die doppelte Kopiezahl in 4 nahe-hexaploiden Metaphasen; vier normale Chromosomen, ein der(2) und ein der(9) in 2 Metaphasen.



45

mcb 3: Ein normales Chromosom, ein $\text{der}(3)\text{t}(3;15)(3\text{A1}\rightarrow 3\text{qter}:\text{cen}:3\text{F3}\rightarrow 3\text{qter}::3\text{qter}\rightarrow 3\text{E2}::15\text{A1}\rightarrow 15\text{qter})$ und ein $\text{der}(6)\text{t}(3;6;10)(3\text{qter}\rightarrow 3\text{A1}::6\text{A3}\rightarrow 6\text{A1}:\text{cen}:6\text{A1}\rightarrow 6\text{qter}::10\text{C3}\rightarrow 10\text{qter})$ fanden sich in 19 Metaphasen (Abb. 21) und die doppelte Kopiezahl in 8 nahe-hexaploiden Metaphasen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Chromosom 3 drei vollständige Kopien plus zusätzliches Material aufweist.

Übereinstimmend mit Subklon 2c fanden sich zwei normale Chromosomen und ein $\text{der}(6)$ einmal. Zwei normale Chromosomen und ein $\text{der}(3)$ fanden sich in 2 Metaphasen und könnten Subklon 2d repräsentieren.

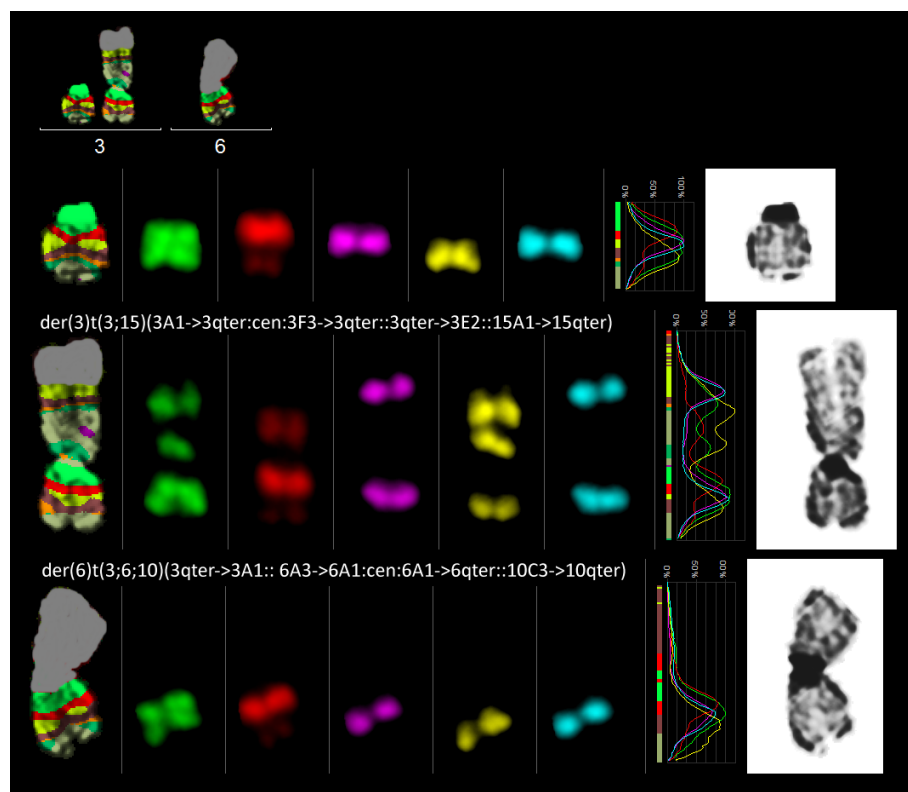


Abb. 21: CT26.WT, mcb 3

mcb 4: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 6 Metaphasen. Drei normale Chromosomen fanden sich in 15 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 4 nahe-hexaploiden Metaphasen; fünf normale Chromosomen in 3 nahe-hexaploiden Metaphasen. Zweimal lag eine nichtklonale Aberration vor.

mcb 5: Ein normales Chromosom, ein $\text{idic}(5;15)$, ein $\text{idic}(5;19)(5\text{qter}\rightarrow 5\text{A1}::19\text{A}\rightarrow 19\text{B})$ und ein $\text{idic}(5)(\text{qter}\rightarrow \text{F}::\text{C3}\rightarrow \text{D}::\text{E5}\rightarrow \text{F}:\text{cen}:\text{E5}\rightarrow \text{C3}::\text{F}\rightarrow \text{qter})$ fanden sich in 24 Metaphasen (Abb. 22) und die doppelte Kopiezahl in 3 nahe-hexaploiden Metaphasen.

Übereinstimmend mit Subklon 2b fanden sich ein normales Chromosom, ein $\text{idic}(5;19)$ und ein $\text{idic}(5)$ in 3 Metaphasen.

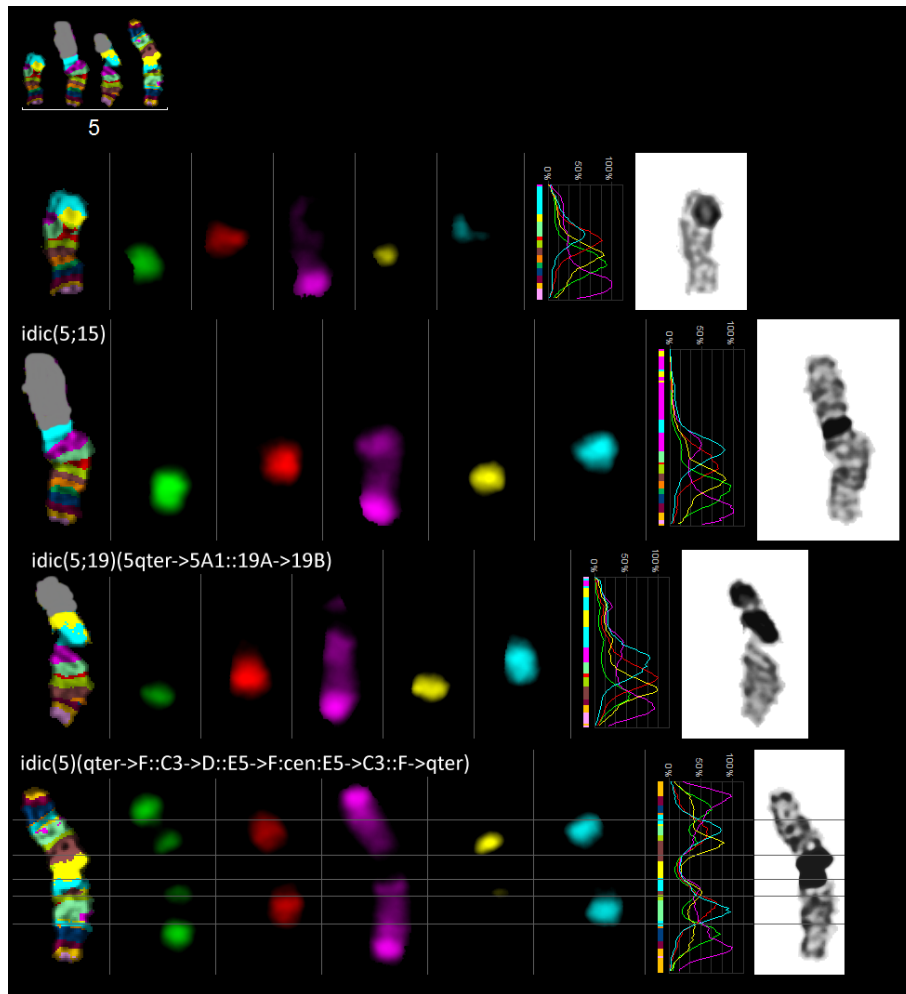


Abb. 22: CT26.WT, mcb 5, die Bruchpunkte von idic(5) sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet

mcb 6: Ein normales Chromosom, ein idic(6) und ein der(6)t(3;6;10) (3qter->3A1::6A3->6A1:cen:6A1->6qter::10C3->10qter) fanden sich in 17 Metaphasen (Abb. 23) und die doppelte Kopiezahl in 8 nahe-hexaploiden Metaphasen; zwei normale Chromosomen, ein idic(6) und ein der(6) in 1 Metaphase und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-hexaploiden Metaphase; vier normale Chromosomen, vier idic(6) und vier der(6) in 3 Metaphasen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Chromosom 6 überwiegend drei vollständige Kopien plus zusätzliches Material aufweist.

Ein der(6)t(6;10), wie es sich in der mFISH bei Subklon 2d zeigte, konnte nicht gefunden werden.

mcb 7: Zwei normale Chromosomen und ein der(7)t(7;19)(7A1->7D2~7E1::19D1->19qter) fanden sich in 1 Metaphase und die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-hexaploiden Metaphasen; drei normale Chromosomen und ein der(7) in 14 Metaphasen (Abb. 24) und die doppelte Kopiezahl in 12 nahe-hexaploiden Metaphasen. Einmal lag eine nichtklonale Aberration vor.

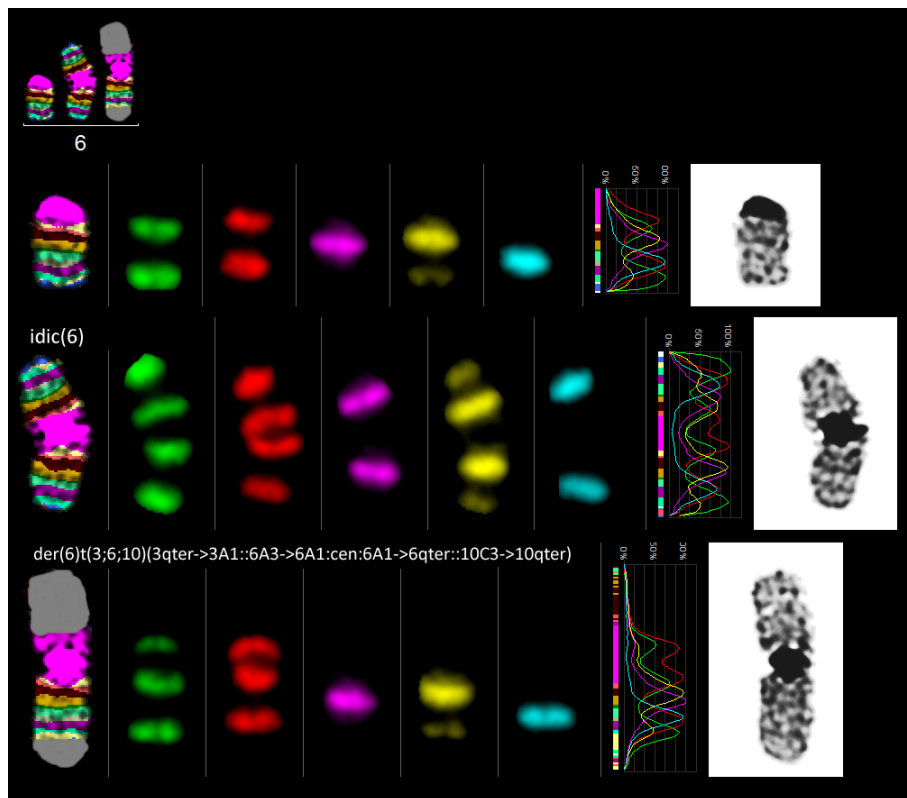


Abb. 23: CT26.WT, mcb 6

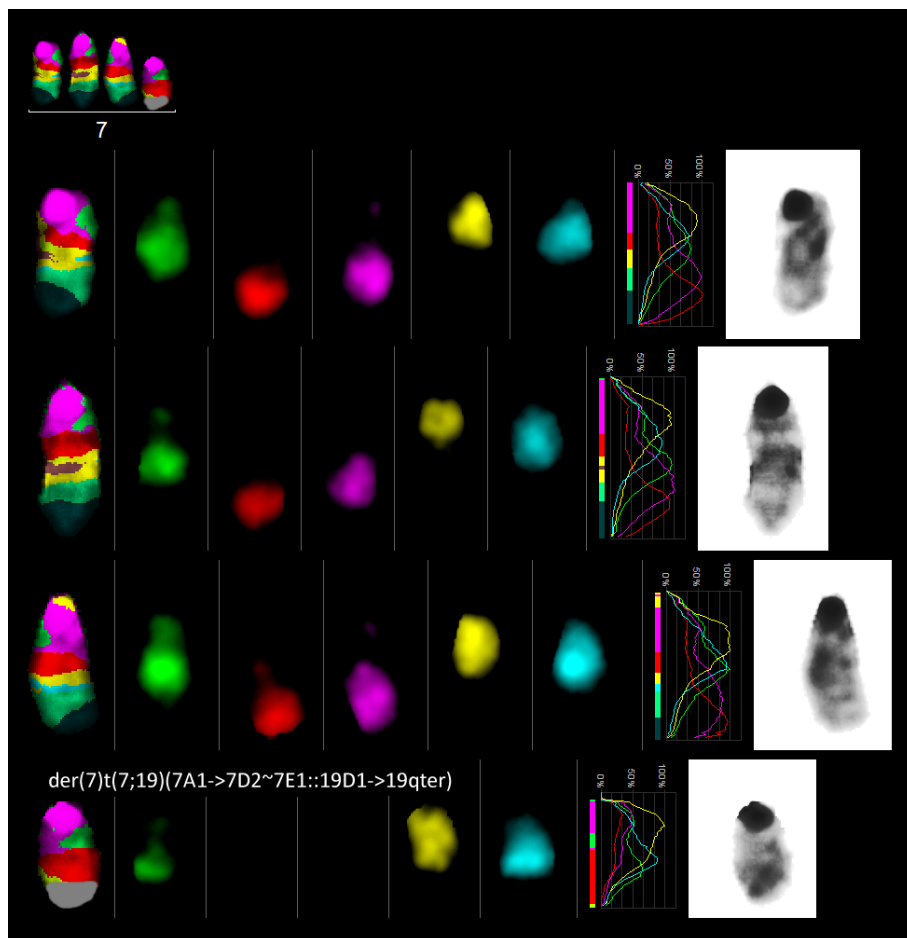


Abb. 24: CT26.WT, mcb 7

mcb 8: Drei normale Chromosomen fanden sich in 2 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 3 nahe-hexaploiden Metaphasen; vier normale Chromosomen in 21 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-hexaploiden Metaphase; zwölf normale Chromosomen in 1 höher-ploiden Metaphase. In 2 Metaphasen lagen nichtklonale Aberrationen vor.

mcb 9: Zwei normale Chromosomen, ein der(2)t(2;9)(:neo->2H2->2C3::9E2->9qter) und ein der(9)t(2;9)(9A1->9E1::2H2->2qter) fanden sich in 20 Metaphasen (Abb. 25) und die doppelte Kopiezahl in 8 nahe-hexaploiden Metaphasen; drei normale Chromosomen, ein der(2) und ein der(9) in 2 Metaphasen.

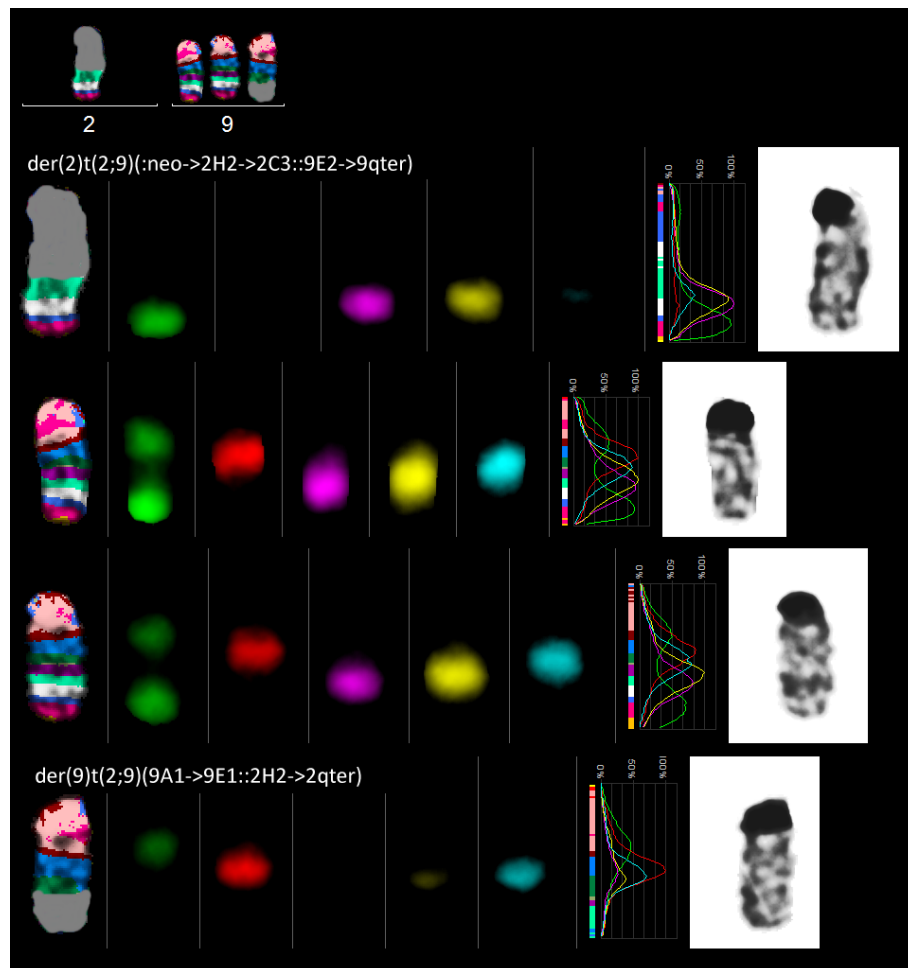


Abb. 25: CT26.WT, mcb 9

mcb 10: Drei normale Chromosomen und ein der(6)t(3;6;10) (3qter->3A1::6A3->6A1:cen:6A1->6qter::10C3->10qter) fanden sich in 20 Metaphasen (Abb. 26), die doppelte Kopiezahl in 8 nahe-hexaploiden Metaphasen und die dreifache Kopiezahl in 1 nahe-nonaploiden Metaphase. Zwei normale Chromosomen und ein idic(10) fanden sich einmal.

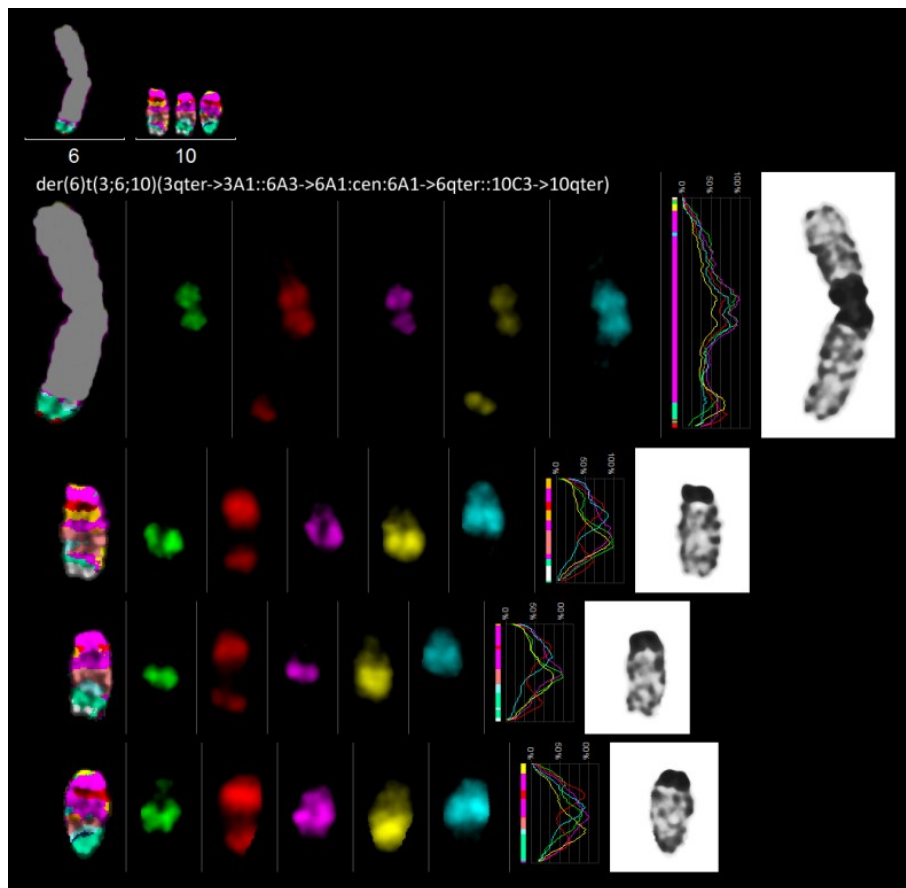


Abb. 26: CT26.WT, mcb 10

mcb 11: Zwei normale Chromosomen fanden sich in 4 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 4 nahe-hexaploiden Metaphasen; drei normale Chromosomen in 14 Metaphasen, die doppelte Kopiezahl in 7 nahe-hexaploiden Metaphasen und die vierfache Kopiezahl in 1 nahe-dodecaploiden Metaphase.

mcb 12: Übereinstimmend mit Klon 1 und seinen Subklonen fanden sich ein normales Chromosom und ein idic(12) in 4 Metaphasen; zwei idic(12) in 1 Metaphase.

Übereinstimmend mit Klon 2 und seinen Subklonen fanden sich ein idic(12) und ein idic(12;X)(12qter->12A1::XA5->Xqter) in 19 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 6 nahe-hexaploiden Metaphasen.

mcb 13: Ein idic(13), ein idic(13;17) und ein neo(13)(:neo->D1?->A5?) fanden sich in 20 Metaphasen (Abb. 27) und die doppelte Kopiezahl in 7 nahe-hexaploiden Metaphasen; zwei idic(13), ein idic(13;17) und ein neo(13) in 1 Metaphase; ein idic(13) und ein neo(13) in 2 Metaphasen.

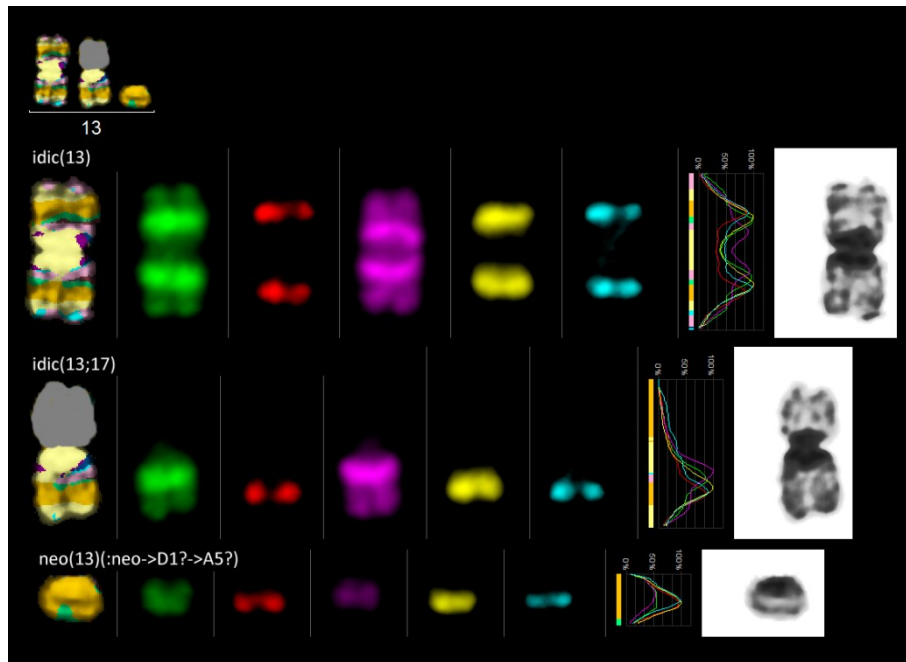


Abb. 27: CT26.WT, mcb 13

mcb 14: Ein idic(14) und ein idic(1;14) fanden sich in 23 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 6 nahe-hexaploiden Metaphasen; ein idic(14) in 1 Metaphase.

mcb 15: Zwei normale Chromosomen, ein idic(5;15) und ein der(3)t(3;15) (3A1->3qter:cen:3F3->3qter::3qter->3E2::15A1->15qter) fanden sich in 7 Metaphasen; drei normale Chromosomen, ein idic(5;15) und ein der(3) in 3 Metaphasen; vier normale Chromosomen, ein idic(5;15) und ein der(3) in 1 Metaphase.

Übereinstimmend mit Subklon 2c fanden sich drei normale Chromosomen und ein idic(5;15) in 5 Metaphasen und übereinstimmend mit Subklon 2b drei normale Chromosomen und ein der(3) in 2 Metaphasen.

Drei normale Chromosomen und zwei der(3) fanden sich einmal, ebenso fünf normale Chromosomen und zwei der(3). Nichtklonale Aberrationen lagen in 3 Metaphasen vor.

mcb 16: Zwei normale Chromosomen fanden sich einmal; drei normale Chromosomen in 22 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 7 nahe-hexaploiden Metaphasen.

mcb 17: Zwei normale Chromosomen und ein idic(13;17) fanden sich einmal; drei normale Chromosomen und ein idic(13;17) in 16 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 8 nahe-hexaploiden Metaphasen; vier normale Chromosomen in 1 Metaphase; ebenso drei normale Chromosomen und ein idic(17). In 3 Metaphasen lagen nichtklonale Aberrationen vor.

mcb 18: Drei normale Chromosomen fanden sich in 12 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 3 Metaphasen.

Übereinstimmend mit den Subklonen 1a und 2e fanden sich zwei normale Chromosomen und eine dup(18)(A1->C::C->qter) in 10 Metaphasen (Abb. 28) und die doppelte Kopiezahl in 5 Metaphasen.

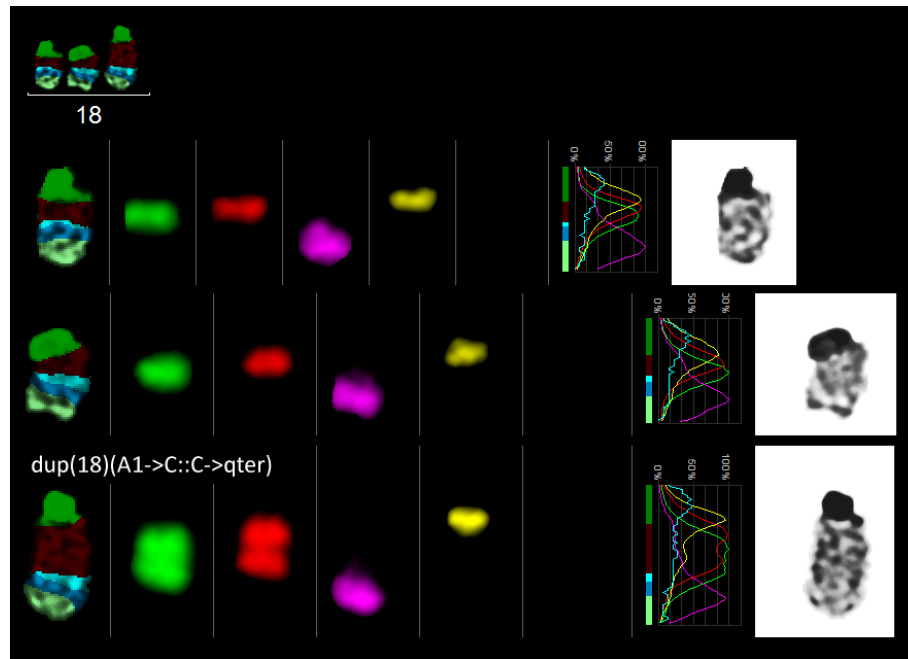


Abb. 28: CT26.WT, mcb 18, Subklone 1a und 2e

mcb 19: Zwei normale Chromosomen, ein idic(5;19)(5qter->5A1::19A->19B) und ein der(7)t(7;19)(7A1->7D2~7E1::19D1->19qter) fanden sich in 1 Metaphase und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-hexaploiden Metaphase; drei normale Chromosomen, ein idic(5;19) und ein der(7) in 9 Metaphasen (Abb. 29) und die doppelte Kopiezahl in 5 nahe-hexaploiden Metaphasen; vier normale Chromosomen, ein idic(5;19) und ein der(7) in 6 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 4 nahe-hexaploiden Metaphasen; fünf normale Chromosomen, ein idic(5;19) und ein der(7) in 1 Metaphase und die doppelte Kopiezahl in 1 nahe-hexaploiden Metaphase. In 2 Metaphasen lagen nichtklonale Aberrationen vor.

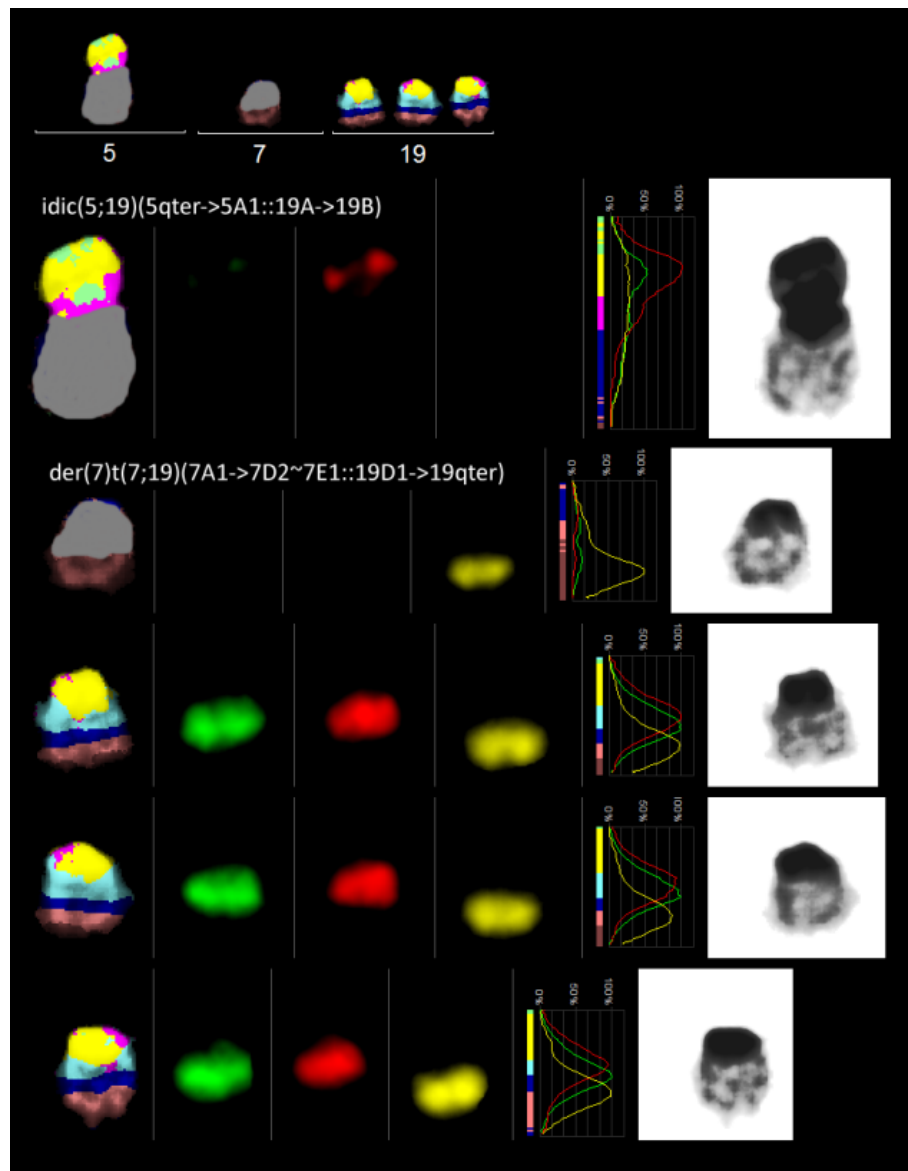


Abb. 29: CT26.WT, mcb 19

mcb X: Übereinstimmend mit Klon 1 fanden sich zwei normale Chromosomen mit verschiedenen langen Zentromeren in 9 Metaphasen und die doppelte Kopiezahl in 6 nahe-hexaploiden Metaphasen.

Übereinstimmend mit Klon 2 fanden sich ein normales Chromosom und ein idic(12;X)(12qter->12A1::XA5->Xqter) in 13 Metaphasen (Abb. 30) und die doppelte Kopiezahl in 2 nahe-hexaploiden Metaphasen.

Einmal lag eine nichtklonale Aberration vor.

Markerchromosomen: Ein bis drei Markerchromosomen, die sich in der mFISH zeigten, konnten im mcb nicht nachgewiesen werden.

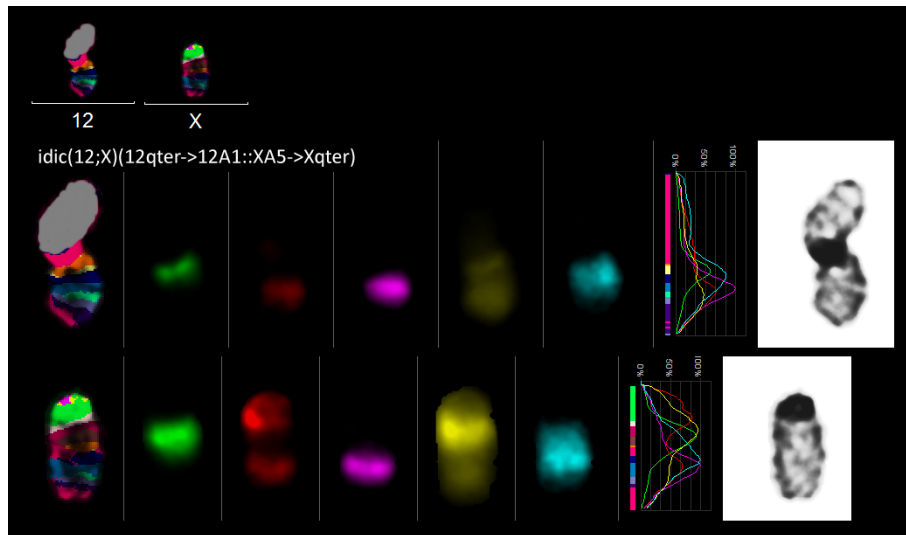


Abb. 30: CT26.WT, mcb X, Klon 2

4.2.2 array-CGH und in-silico-Translation

Tab. 4, Abb. 31 und Abb. 32 enthalten die Ergebnisse der array-CGH und der in-silico-Translation. Die Ergebnisse der array-CGH stimmten mit den Ergebnissen der molekularen Zytogenetik weitgehend überein (Näheres siehe Kapitel 5.1.2 und 5.1.3).

Tab. 4: Ergebnisse der array-CGH und der in-silico-Translation, getrennt nach Zugewinnen, Verlusten und Bruchpunkten. Einbezogen wurden auch nichtklonale Aberrationen aus mcb 15 und 17.

| Region | Zugewinn | Homologe Region im Humangenom | |
|------------|----------|-------------------------------|------------------------|
| | | Zytobande | Position (GRCh37/hg19) |
| 1qA1 - qH6 | x1 | 8q11.21-q12.1 | 8:49798969-55650088 |
| | | 8q12.2-q21.13 | 8:66403591-75214401 |
| | | 6p12.2-p12.3 | 6:49813958-52703905 |
| | | 6p12.1-q13 | 6:56359076-73210217 |
| | | 2q14.3-q21.1 | 2:128090979-131153454 |
| | | 2q11.2-q12.3 | 2:96498200-106203263 |
| | | 2q32.2 | 2:188142550-189639740 |
| | | 2q32.2-q32.3 | 2:189641350-195728065 |
| | | 2q32.3-qtr | 2:195728066-241869966 |
| | | 5q21.1-q21.2 | 5:99084032-103392710 |
| | | 18q21.32-q22.1 | 18:60684670-67661356 |
| | | 2q14.3 | 2:121828372-125590121 |
| | | 2q21.2-q22.1 | 2:132380816-137850173 |
| | | Y1q11.23 | Y:26212371-26397883 |
| | | 1q21.1 | 1:143925313-145127773 |
| | | 1q32.2-q42.13 | 1:207402594-227457026 |
| | | 1q43-q44 | 1:240057965-246962441 |
| | | 1p11.2 | 1:121135999-121390756 |
| | | 1q23.1-q32.2 | 1:158547113-207361619 |
| | | 13q33.1 | 13:102585255-102881564 |
| 2qC3 - qtr | x1 | 11q11-q12.1 | 11:55313107-57986386 |
| | | 11q11.12 | 11:49917841-50058608 |
| | | 11q11.12-q14.3 | 11:26188819-48637160 |
| | | 20p13 | 20:142056-1467297 |

| | | | |
|------------|----|--|--|
| | | 20p11.1-p13 20q11.21-13.32 20q13.32-q13.33 15q13.3-q21.2 2p11.2 2q11.1-q11.2 2q13-q14.1 | 20:1755455-25625984 20:31301793-59481159 20:59573167-64276082 15:32614079-51005976 2:87118510-87696552 2:94976532-96374879 2:110637663-112892430 |
| 3qE2 – qF2 | x1 | 7q11.23 3q25.1-q26.2 4q32.1-q32.2 4q31.3-q32.1 4q22.3-q27 | 7:76653413-76946262 3:149338029-168104318 4:160328589-162175360 4:150045231-160313119 4:94363548-119782165 |
| 3qF3-qtr | x2 | 1q21.2-q23.1 1q21.1 1p11.2-p22.1 1p22.1-p31.3 | 1:147100246-158184951 1:145600873-146297768 1:93439600-120801119 1:68121446-89272452 |
| 5qC3-qD | x2 | 4p16.3-q22.1 | 4:4183016-88079035 |
| 5qE1-qF | x1 | 1p22.2-p22.3 4p16.3 12q24.33 22q11.23-q12.1 12q23.3-q24.11 12q24.11-q24.31 | 1:89498675-93369782 4:559243-1058871 12:131894446-132945956 22:24805798-28760295 12:107931580-110048615 12:110050988-121059734 |
| 5qF-qtr | x2 | 12q24.31-q24.33 7p11.2 7q11.21-q11.23 7q11.23 7q22.1 7p22.1-ptr 7q21.3-q22.1 13q12.13-q13.2 | 12:121109639-131852016 7:55951659-56116445 7:67371788-72722850 7:73145680-76520510 7:99955218-102551307 7:115497-6732018 7:97968996-99631744 13:26210757-33680968 |
| 6qA1 – qA3 | x2 | 7q31.1-q32.1 7p21.3-p22.1 7q21.2-q21.3 | 7:112498864-128461586 7:7093365-12492920 7:93101327-97872805 |
| 6qA3-qtr | x1 | 12p11.21-p13.31 12p13.31- p13.33 12p13.31 12p13.33 10q11.21-q11.22 4q27 4q22.1-q22.3 3p25.2 3p25.2-ptr 3p12.3-p14.1 3q21.3 3p25.1 3q22.1 2p13.3 2p11.2-p13.3 2p11.2 1p31.1 7p11.2 7p14.3-p15.3 7q32.1-q36.1 7q36.1 | 12:9748769-32384500 12:2793954-7543294 12:7905547-9061868 12:12900-2743910 10:42782538-45674259 4:120041924-121273532 4:88257546-94351949 3:12075139-12855873 3:12360-12059043 3:64032928-75273450 3:126006258-129319641 3:12897779-15118656 3:129376089-129895684 2:68487905-70797831 2:70805311-86867996 2:88002903-88874857 1:67166227-67851415 7:55364682-55573516 7:23214537-33063634 7:128671928-149886174 7:150335378-150863779 |
| 7qA1-qD1 | x1 | 16p13.11 19q13.42-q13.43 19q13.43 19q13.31-q13.33 | 16:16158958-16294817 19:53786804-56988760 19:58012427-58578185 19:44505958-48204443 |

| | | | |
|--------------|----|---|---|
| | | 19q12-q13.31 19q13.33-q13.41 11p14.3-p15.1 15q13.1 15q11.2 15q11.2-q13.1 15q13.1-q13.3 15q26.3 15q26.1-q26.3 | 19:28098773-44388117 19:48296760-51418703 11:17381938-25229599 15:28570709-28682263 15:22476134-23039846 15:23561415-28340921 15:28862278-32286393 15:98537156-101725667 15:91049828-98534827 |
| 8qA1.1 – qE2 | x1 | 4q32.2-qtr 4q31.1-q31.3 16q23.1-qtr 16q22.1-q23.1 16q11.2-q22.1 1q42.13 1q21.1 10p11.21-p11.22 13q12.11 13q14.3 13q33.1-qtr 19p13.2 19p13.11-p13.12 19p13.12-p13.13 22q12.3 8p23.2-p23.3 8p22-23.1 8p23.1 8p11.23-p12 8p11.21-p11.23 8p23.1-p23.2 8p23.2 8p21.3-22 21p11.2 | 4:162582872-189963502 4:140330768-149971177 16:74408145-90043622 16:70075624-74311815 16:46659361-69942202 1:229229193-235161459 1:146542324-146899900 10:32752983-34863341 13:19410576-19553321 13:51812906-52637583 13:102881565-114327455 19:7112172-8069598 19:16052230-19664128 19:12627694-14572196 22:33262346-35459147 8:397986-5501230 8:12721564-18101445 8:8251254-9782907 8:29332949-36820056 8:36859024-42639769 8:5904979-6718069 8:5510625-5890510 8:18135309-20320465 21:9594592-9809818 |
| 10qC1 - qtr | x1 | 12q23.3 22q12.3 12q13.2-q23.3 | 12:103965531-107783160 22:32387312-33076428 12:54962426-103957729 |
| 13qA3-qC3 | x1 | 6p22.3-ptr 6p22.3 9q22.1-q22.32 9q21.32-q22.1 9q22.32-q22.33 9q21.11 9q13 9p12-p13.1 9p11.1-p11.2 5q35.2-q35.3 5q31.1-q31.2 5p15.31-p15.33 5q14.3-q15 | 6:181261-17755386 6:17758154-20060567 9:88426259-94305430 9:83617040-87725484 9:94558675-96664521 9:66985272-67553332 9:61321216-61453115 9:38669564-39362991 9:41807600-42190916 5:174325424-177612610 5:134737788-137755249 5:191310-7935328 5:85240523-96808680 |
| 15qA1 - qF3 | x1 | 12q12-q13.2 12p11.1 22q12.3-q13.33 5p12-p15.31 8q24.23-q24.3 8q22.1-q24.23 | 12:38213339-54655672 12:33053427-34105230 22:35566904-50784010 5:8927633-42888873 8:136870681-144619253 8:96434404-136853592 |
| 17qA1 - qE5 | x1 | 16p13.3 19p13.2-p13.3 19p13.2 19p13.12 | 16:176594-3184624 19:4229085-6940562 19:8301803-8698881 19:15159485-15697397 |

| | | 21q11.1 21q22.3 5q15-q21.1 5q21.2-q22.1 5q35.1 18p11.32 18p11.22-p11.32 2p16.2-p23.2 2q12.3 3p24.3 6q25.2-q25.3 6q25.3-q27 6q27 6p21.2-p21.32 6 p21.32-p22.1 6p12.3-p21.2 | 21:6006586-6141527 21:42070393-43703062 5:96866613-99069535 5:103423614-110727320 5:172519748-173295346 18:861721-2534401 18:2534402-9972544 2:28810654-53031720 2:106767529-108195055 3:16266324-20190407 6:154731949-159680614 6:159682000-167138582 6:167442131-170584666 6:33500959-39090282 6:29393610-33329441 6:39298722-49714113 |
|----------------------|----------------------------------|--|---|
| 18qB3-qC | x1 | 5q22.2-q31.1 | 5:112975039-131003659 |
| 19qD1-qtr | x1 | 10q23.2-q26.11 | 10:87474356-119459995 |
| 19qA-qB | x1 | 11q12.1-q13.3 9q21.11-q21.31 | 11:58108647-68942254 9:68221841-80162449 |
| Region | Verlust | Homologe Region im Humangenom | |
| | | Zytobande | Position (GRCh37/hg19) |
| XqA1-qA4 | x1 | Xp11.22-p11.23 Xp11.23-p21.1 Xq23-q24 Xq24-q25 | X:48455475-51616130 X:37491877-47660779 X:115988254-118451148 X:118452702-127335026 |
| Bruchpunkt Region | Bruchpunkt Art (* balanciert) | Homologe Region im Humangenom | |
| | | Zytobande | Position (GRCh37/hg19) |
| 1qA1 | isodizentrisch | 8q11.3 | 8:51610840-52610839 |
| 2qC3 | Translokation | 2q24.3 | 2:163093397-164093396 |
| 2qH2 | Translokation | 20q13.12 | 20:44385677-45385676 |
| 3qA1 | isodizentrisch | 8q21.13 | 8:79534746-80534745 |
| 3qE1 | Translokation | 3q25.32 | 3:157605856-158605855 |
| 3qF3 | Translokation | 1p13.3 | 1:106556680-107556679 |
| 5qA1 | isodizentrisch | 7q21.11 | 7:84495554-85495553 |
| 5qC3 | Translokation | 4p16.3-q22.1 | 4:4183016-88079035 |
| 5qE5 | Translokation | 4p12 | 4:45535770-46535769 |
| 6qA1 | isodizentrisch | 7q21.3 | 7:94407203-95407202 |
| 6qA3 | Translokation | 7q34 | 7:138206296-139206295 |
| 6qG3 | Translokation | 12p12.2 | 12:19869246-20869245 |
| 7qD1 | Translokation | 15q25.3 | 15:87359752-88359751 |
| 9qE1 | Translokation* | 6q14.1 | 6:78435868-79435867 |
| 10qC1 | Translokation | 12q23.3 | 12:103450203-104450202 |
| 12qA1 | isodizentrisch | 2p24.2 | 2:17039127-18039126 |
| 13qA1 | isodizentrisch | 10p15.2 | 10:2566334-3566333 |
| 13A3.3 | Translokation | 6p24.3 | 6:8339483-9339482 |
| 13qC3 | Translokation | 5q14.3 | 5:90015612-91015611 |
| 14qA1 | isodizentrisch | 3p14.2 | 3:59249311-60249310 |
| 15A1 | isodizentrisch | 5p14.1 | 5:25083020-26083019 |
| 15qF1 | Translokation | 12q12 | 12:45419132-46419131 |
| 17qA1 | isodizentrisch | 6q25.3 | 6:156277375-157277374 |
| 18qB3 | Duplikation | 5q23.2 | 5:121351956-122351955 |
| 19qB | Translokation | 9q21.13 | 9:73997366-74997365 |
| 19qD | Translokation | 10q24.32 | 10:102418294-103418293 |
| XqA4 | Translokation | Xq25 | X:122684154-123684153 |
| XqA5 | Translokation | Xq27.1-q27.2 | X:140502592-141502591 |

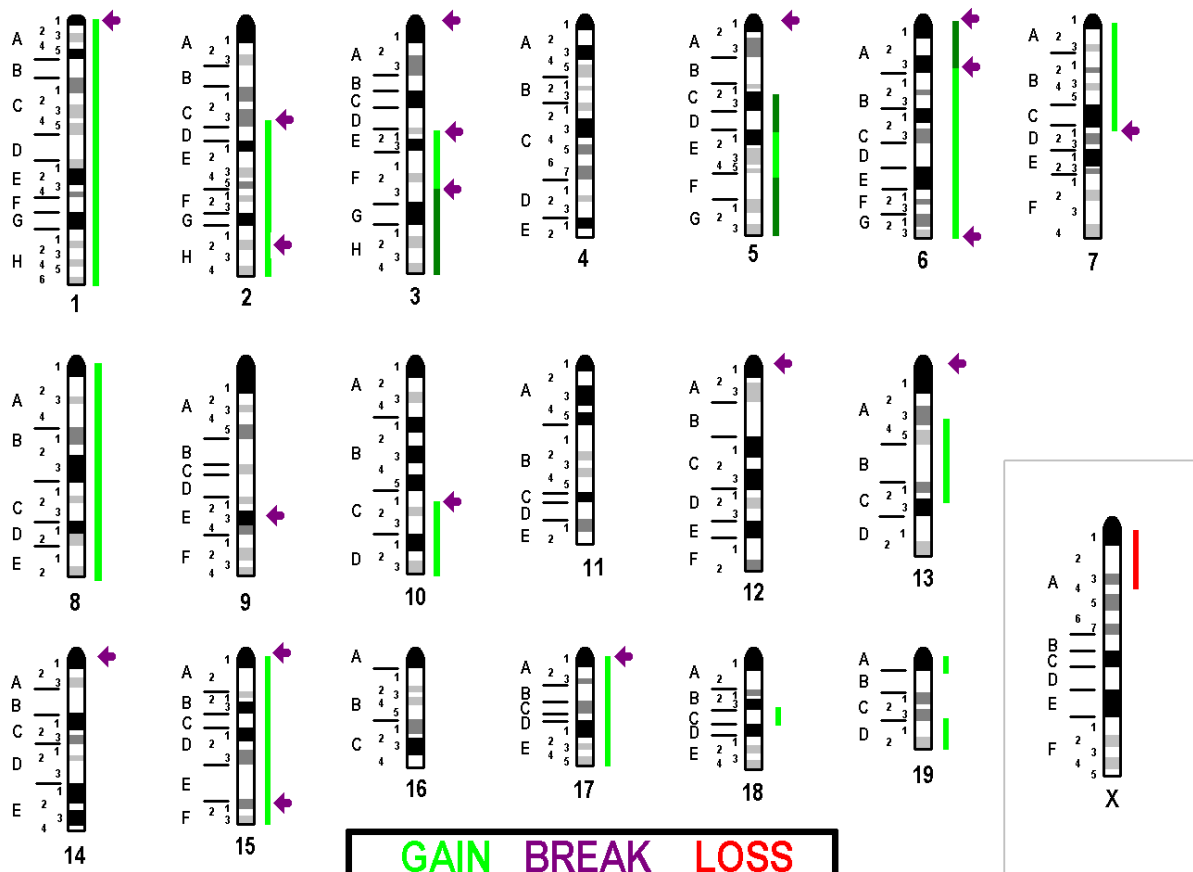


Abb. 31: Ergebnisse der array-CGH für das Mausgenom für CT26.WT: Gain = Zugewinn (dunkelgrün = zweifache dreifache Amplifikation), Break = ausgewählte Bruchpunkte, Loss = Verlust

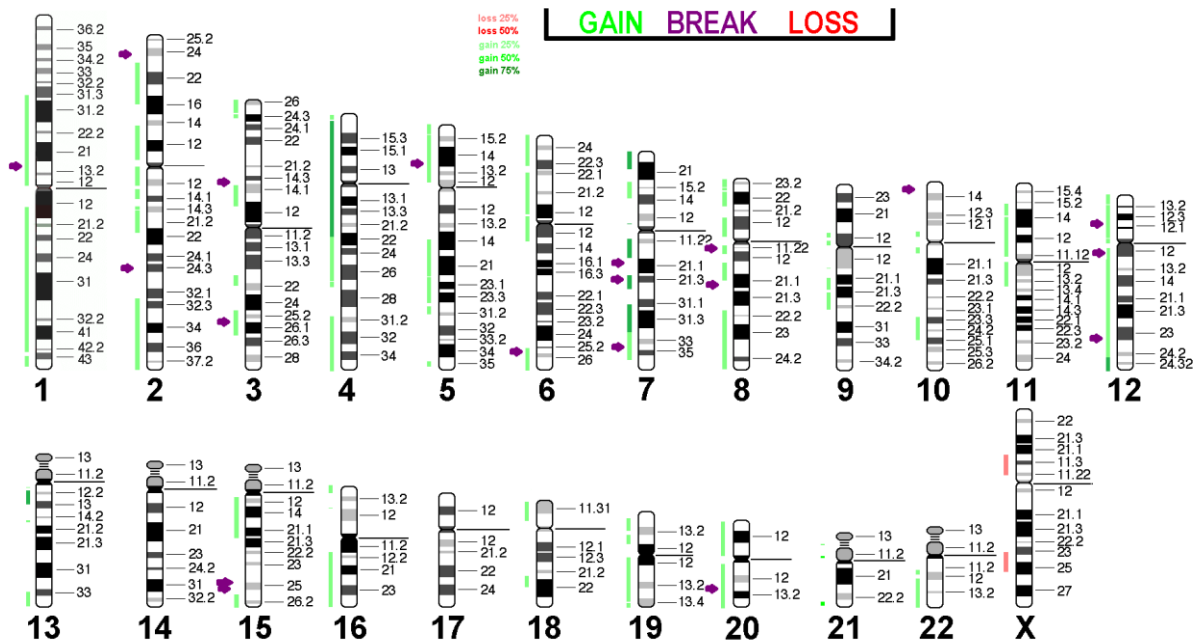


Abb. 32: Ergebnisse der in-silico-Translation in das Humangenom für CT26.WT (Gain = Zugewinn, Loss = Verlust, Break = ausgewählte Bruchpunkte)

4.2.3 Zusammengesetzter Karyotyp

Aus den Ergebnissen von mFISH, mcb und array-CGH konnte folgender zusammengesetzter Karyotyp ermittelt werden:

57~64,XX,idic(1;14),+1x2,+2,+der(2)t(2;9)(:neo->2H2->2C3::9E1->9qter),+der(3)t(3;15)
(3A1->3qter:cen:3F3->3qter::3qter->3E1::15A1->15qter),+4,idic(5;15),idic(5;19)
(5qter->5A1::19A->19B),+5,+idic(5)(qter->F::C3->D::E5->F:cen:E5->C3::F->qter),
idic(6),+6,+der(6)t(3;6;10)(3qter->3A1::6A3->6A1:cen:6A1->6qter::10C3->10qter),
+7,+der(7)t(7;19)(7A1->7D1::19D1->19qter),+8x2,+der(9)t(2;9)(9A1->9E1::2H2->2qter),
+10,+11,idic(12),idic(12;X)(12qter->12A1::XA5->Xqter)[18],+12,idic(13),idic(13;17),+13,
+neo(13)(:neo->A3->C3),idic(14),+14,+15,+16,+17x2,+18,+dup(18)(A1->C::B3->qter)[10],
+19[5],+19x2[22],+mar[10],+marx2[8],+marx3[6] [cp27] / 118~121,idem x 2 [cp3]

5 Diskussion

5.1 Methodenkritik

5.1.1 mFISH

Gegenüber klassischen Bänderungstechniken ermöglicht die mFISH eine einfache und eindeutige Identifizierung aller Mausechromosomen und gibt einen Überblick über vorhandene strukturelle Chromosomenaberrationen (Schröck et al. 2006). So waren auch in dieser Arbeit eine Karyotypisierung beider Zelllinien und die Unterteilung in Zellklone und -subklone weitgehend problemlos möglich.

Entscheidende Limitationen der Methode ergeben sich jedoch, wie in der Literatur beschrieben, bei der Analyse komplexerer und kleinerer chromosomaler Aberrationen (Kearney 2006). So ist die Erkennung intrachromosomaler Rearrangements wie Inversionen und Duplikationen nicht möglich. Dies zeigte sich beispielsweise für das Derivatvchromosom der(8)(A1->D1::D1->C2) des Klons 2 von CMT-93, welches in der mFISH nicht von normalen Chromosomen zu unterscheiden war und allenfalls die auffällige DAPI-Bänderung einen Hinweis auf vorhandene Rearrangements gab (Abb. 8 Seite 30).

Weiterhin bestehen Schwierigkeiten bei der Klassifizierung kleiner Translokationen und Insertionen von weniger als 10 Megabasenpaaren. Hierbei macht sich das sogenannte „Flaring“ bemerkbar, bei dem sich im Bereich des Bruchpunktes die Fluoreszenzsignale beider Chromosomenabschnitte überlagern und somit zu einer verfälschten Signalkonstellation für den kleineren Abschnitt führen. Dieses Problem konnte für die Translokationen der(6)t(3;6;10) und der(7)t(7;19) von CT26.WT beobachtet werden, bei denen die Signale für die Translokationen von Chromosom 10 und 19 in einigen Metaphasen von Signalen der angrenzenden Abschnitte von Chromosom 6 bzw. 7 überlagert wurden (Abb. 18 und Abb. 19 Seite 43 und 44).

Darüber hinaus können Markerchromosomen bzw. sehr kleine Deletionen nicht ihrem ursprünglichen Chromosom zugeordnet werden, wie auch in dieser Arbeit festgestellt wurde. Die Markerchromosomen von CT26.WT zeigten sehr verschiedene und nicht eindeutige Signale.

Ein weiteres Problem ergab sich aus der schwankenden Signalintensität des Fluorochroms Cy5 bei teilweise starkem Hintergrundrauschen (Lu et al. 2000). So konnten beispielsweise Chromosom 7 und 17 in einigen Metaphasen nur mithilfe des Vergleichs der Chromosomenlänge sicher unterschieden werden.

Die Ursachen für die genannten Limitationen sind in (1) der Chromosomen- und Metaphasenpräparation, (2) dem Grad der Chromosomenkondensation, (3) der Qualität der Hybridisierung, (4) der Sondengröße und (5) der Auswahl der Fluorochrome zu suchen (Kearney 2006). Punkt 1 und 2 waren insbesondere für CT26.WT bedeutsam (siehe Kapitel 5.1.2), während Punkt 4 und 5 aufgrund der verwendeten kommerziellen Sonden nicht beeinflussbar waren.

Zusammenfassend lässt sich bestätigen, dass die mFISH nicht allein, sondern nur in Kombination mit anderen Verfahren zur Karyotypisierung muriner Zellen genutzt werden sollte (Leibiger et al. 2013).

5.1.2 mcb

Die Stärke des mcb, auch komplexe und intrachromosomale Aberrationen zuverlässig zu erfassen und zu lokalisieren, wurden in dieser Arbeit bestätigt. So erwies sich das mcb beispielsweise bei der Aufklärung des aberranten Chromosoms 8 von CMT-93 sowie des Derivatvchromosoms der(3)t(3;6;10) und des rearrangierten idic(5) von CT26.WT als unerlässlich. Die Ergebnisse waren im Rahmen der jeweils untersuchten Zahl von 30 Metaphasen reproduzierbar, auch bei variierendem Kondensationsgrad bzw. schwankender Chromosomenlänge. Viele der unklaren Befunde, die die mFISH bei kleinen Translokationen und Deletionen lieferte (siehe Kapitel 5.1.1), konnten durch das mcb aufgelöst werden. Die Ergebnisse der array-CGH sind mit den Ergebnissen des mcb vereinbar und bestätigen damit dessen Übertragbarkeit (Leibiger et al. 2013, Bint et al. 2013).

Trotz der genannten Vorteile besitzt die Methode auch einige Einschränkungen:

- Bei komplexen Aberrationen kann es (wie bei der mFISH) zur Überlappung von mcb-Banden („Flaring“) und somit zur fehlerhaften Beurteilung des Übergangsbereichs zu translozierten Chromosomenabschnitten kommen (Lee et al. 2001).
- Bei unterschiedlichem Kondensationsgrad bleibt das Bänderungsmuster zwar identisch, die Größe der einzelnen Banden kann jedoch deutlich variieren (Chudoba et al. 1999). Schwierigkeiten ergeben sich dadurch bei der Lokalisation von Bruchpunkten in Chromosomenabschnitten, die von denselben mcb-Banden abgedeckt werden.
- Durch qualitative Differenzen bei der Hybridisierung können Fluoreszenzsignale bei gleicher Bandenlänge stärker oder schwächer ausfallen.
- Bei Markierung repetitiver Sequenzen v. a. im Zentromerbereich kann es zur fehlerhaften Beurteilung zentromernaher Chromosomenabschnitte kommen. Zahlreiche

repetitive Sequenzen liegen auch im Y-Chromosom vor, sodass ein mcb in diesem Fall nicht sinnvoll ist (Kosyakova et al. 2013a, Kosyakova et al. 2013b).

- Die Auflösung ist (wie beim humanen MCB) auf etwa 5 bis 10 Megabasenpaare begrenzt (Weise et al. 2008).

Im Detail lagen bei den untersuchten Zelllinien folgende Probleme vor:

Für CMT-93 zeigten sich beim Vergleich der Ergebnisse von mcb und array-CGH geringfügige Differenzen in den Bruchpunktlokalisation auf Chromosom 2 und 8. Jedoch sind alle Lokalisationen aus der array-CGH mit den Ergebnissen der mcb vereinbar, da es sich in allen Fällen um Chromosomenabschnitte handelte, die von denselben mcb-Banden abgedeckt wurden und somit hinsichtlich der Längen- oder Stärkeneinschätzung der mcb-Banden ein gewisser Interpretationsspielraum besteht. Aus den genannten Gründen wurden für die zusammenfassende Darstellung bei abweichenden Bruchpunktlokalisationen die Ergebnisse der array-CGH und nicht die der mcb herangezogen.

Für CT26.WT gestaltete sich die Chromosomenpräparation schwierig, da trotz mehrerer Versuche der Inkubation mit Colcemid keine ausreichenden Mengen an Metaphasen präpariert werden konnten. Die für diese Arbeit verwendete Zellsuspension enthielt dadurch vergleichsweise wenig Metaphasen sowie einen gewissen Anteil von Metaphasen mit stark kondensierten bzw. verkürzten Chromosomen. Trotz Wiederholungen besaßen nicht alle hybridisierten Objektträger eine ausreichende Zahl geeigneter Metaphasen, sodass in einigen Fällen auch stark kondensierte bzw. verkürzte Chromosomen analysiert werden mussten. Als Beispiel dafür siehe Abb. 20, Abb. 21 und Abb. 27 auf Seite 45, 46 und 51. Die Analyse aller Chromosomen war zwar möglich, die exakte Lokalisierung der Bruchpunkte jedoch in einigen Fällen erschwert.

Die in der mFISH für CT26.WT erfassten Markerchromosomen konnten im mcb nicht nachgewiesen werden. Hierfür kommen mehrere Ursachen in Betracht: ein zu schwaches Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Hintergrundrauschen und zur eventuellen Kreuzhybridisierung mit Zentromeren; zu kurze Chromosomenabschnitte, die von den längeren mcb-Sonden nicht abgedeckt werden konnten sowie variables Ursprungsmaterial, was sich durch die verschiedene Anzahl der Markerchromosomen und durch Größenschwankungen verschiedener anderer Chromosomen in den mFISH-Metaphasen andeutete.

5.1.3 array-CGH

Zur Analyse von Kopiezahlveränderungen ist die array-CGH seit langem für Mensch und Maus etabliert (Cho et al. 2006) und lieferte auch für diese Arbeit zuverlässige Ergebnisse, die mit den Befunden des mcb verglichen werden konnten. Da letzteres eine begrenzte Auflösung für Imbalancen von etwa 5 bis 10 Megabasenpaaren aufweist, konnten aus der array-CGH nur Imbalancen mit einer Größe von mehr als 3,5 Megabasenpaaren berücksichtigt werden. Kleinere Imbalancen lagen laut array-CGH zwar vor, können aber zum jetzigen Zeitpunkt nicht molekular-zytogenetisch überprüft werden, da geeignete lokusspezifische Sonden nicht zur Verfügung stehen (Kubicova et al. 2017).

Wie in der Literatur bekannt, zeigten sich Schwierigkeiten bei der korrekten Wiedergabe der Kopiezahl ganzer Chromosomen. Da in beiden Zelllinien di-, tri- und tetraploide Anteile gemischt vorlagen, waren die angegebenen Kopiezahlen für einige Chromosomen nicht eindeutig, sodass in diesen Fällen auf die Befunde der mFISH und des mcb zurückgegriffen wurde.

5.1.4 Sequenzierung (Literaturvergleich für CT26.WT)

Für CT26.WT wurden durch Castle et al. bereits Sequenzierungsergebnisse publiziert (Castle et al. 2014) (vergleiche Kapitel 2.2.3). Die dabei ermittelten Kopiezahlen stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit im Wesentlichen überein. So konnte die inhomogene Kopiezahl mit großen Abschnitten von Triploidie und Tetraploidie bestätigt werden. Die von den Autoren beispielhaft mitgeteilten Kopiezahlen der Chromosomen 6 (vierfach), 13, 14 (dreifach), 15 (fünffach) und X (zweifach) fanden sich auch in der mcb-Analyse wieder, allerdings für Chromosom 15 nur in einem Teil der Metaphasen und für Chromosom 6 und X mit je einer unvollständigen Kopie. Für das restliche Genom publizierten Castle et al. (2014) Kopiezahlen nur als Bilddarstellung. Im orientierenden Vergleich mit den Daten der mcb- und array-CGH-Analyse zeigte sich weitgehende Übereinstimmung für die ermittelten Imbalancen auf Chromosom 2, 3, 8, 10, 13, 15, 17 und 18, umschriebene Abweichungen hingegen für Chromosom 4, 5, 6 und 19. Auch fand sich die klonale Deletion des X-Chromosoms in den publizierten Daten nicht wieder.

Ursachen für die genannten Unterschiede können zum einen durch die Verschiedenheit der Methoden, zum anderen durch Zellkultur-bedingte Modifikationen des Untersuchungsmaterials (vergleiche Kapitel 5.2.5 und 5.2.7) erklärt werden. So verwendeten Castle et al. (2014) einen speziellen Algorithmus, welcher Kopiezahlen mit einer größeren

Streuungsbreite, insbesondere für kurze Sequenzabschnitte generierte. Weiterhin ist anzunehmen, dass Imbalancen kleiner Sequenzabschnitte und einzelner Gene unabhängig von der Kopiezahl größerer Chromosomenabschnitte auftreten. Ebenfalls zu beachten ist die größere Auflösungsrate des mcb und der array-CGH für Imbalancen im Vergleich zur Sequenzierung, während sich klonale und nichtklonale Veränderungen bzw. Mosaik ausschließlich mittels molekularer Zytogenetik identifizieren lassen (Liehr 2014). Um offene Fragen zu klären, wären weitere Studien mit einem detaillierten Datenvergleich beider Methoden notwendig.

5.2 Zytogenetische Charakterisierung

5.2.1 Chromosomensatz

CMT-93 weist einen hyperdiploiden, CT26.WT einen hypertriploiden Chromosomensatz auf. Ähnliche Befunde zeigen sich in vielen aneuploiden KRK und humanen Tumorzelllinien (Knutsen et al. 2010). Für die Entstehung aus einem ursprünglich diploiden Karyotyp kommen prinzipiell zwei Mechanismen in Frage, zum einen die Amplifikation einzelner Chromosomen durch Non-Dysjunktion, zum anderen eine initiale Verdoppelung (Tetraploidisierung) mit anschließendem Verlust einzelner Chromosomen. Als Auslöser für Letzteres kommen die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die Deregulierung von Mitosefaktoren sowie eine Dysfunktion der Telomere in Betracht (Davoli und de Lange 2012).

Je nach Sichtweise würde es sich in beiden Zelllinien entweder um eine Amplifikation oder um eine Deletion weiter Genomabschnitte handeln. Die in beiden Zelllinien nur diploid vorliegenden Gonosomen sowie das Auftreten amplifizierter Abschnitte mit Neozentromeren heben jedoch die Amplifikation in ihrer Bedeutung hervor. Daher werden die ermittelten Imbalancen im Folgenden als Amplifikationen eines diploiden (CMT-93) bzw. triploiden Chromosomensatzes (CT26.WT) postuliert (siehe auch Kapitel 5.2.4).

5.2.2 Klonale Einteilung

Beide Zelllinien zeigen klonale Veränderungen. Für CMT-93 sind davon ausschließlich Chromosom 2, 8, 5 und X betroffen, während Aberrationen anderer Chromosomen in höchstens 6,6 % der Metaphasen auftreten und somit als nichtklonal anzusehen sind (siehe Kapitel 5.2.3). Für CT26.WT lässt sich eine größere Zahl klonaler Aberrationen feststellen.

Während sich die klonale Einteilung und Evolution für CMT-93 problemlos darstellen ließ, gestaltete sie sich für CT26.WT schwieriger. Zwar ließen sich anhand eines vollständigen oder deletierten X-Chromosoms zwei größere Klone feststellen. Jedoch zeigten sich bei der Definition von Subklonen Probleme, da beispielsweise die Duplikation $\text{dup}(18)$ und das Derivatvchromosom $\text{der}(17)\text{t}(15;17)$ als Subklone oder Einzelaberrationen in beiden Klonen auftraten und somit keine klonale Abstammung ermittelbar ist. Weiterhin könnten die Subklone, die durch Verlust einzelner Aberrationen definiert wurden, gleichermaßen als nichtklonale Kopiezahlvarianten angesehen werden (siehe Kapitel 5.2.3.1). Daher wurde für CT26.WT im zusammengesetzten Karyotyp auf eine klonale Unterteilung verzichtet und nur zwei Subklone berücksichtigt, deren Imbalancen sich auch in den Ergebnissen der array-CGH wiederfinden.

5.2.3 Nichtklonale Veränderungen

5.2.3.1 Numerische Aberrationen

Beide Zelllinien zeigen eine hohe Variabilität der Kopiezahlen ganzer Chromosomen. Es handelt sich dabei um keine klonalen Veränderungen, da in fast jeder Metaphase eine andere Konstellation von Chromosomenzahlen vorliegt. Dieser Befund ist typisch für chromosomal instabile Tumoren wie auch speziell für Darmtumorzelllinien, und korreliert mit dem Ploidiegrad (Knutsen et al. 2010).

5.2.3.2 Strukturelle Aberrationen

In beiden Zelllinien wurden zahlreiche strukturelle Aberrationen festgestellt (Tab. 8 bis Tab. 11 auf Seite 79 bis 82), die sich in weniger als 2 von 30 (6,6 Prozent) der analysierten Metaphasen wiederfanden und somit als nichtklonal gelten (Heng et al. 2016). Es handelte sich in der Regel um einfache Chromosomenbrüche, deren Fragmente in einigen Fällen transloziert oder deletiert waren. Auffallend ausgeprägt war die Instabilität von Chromosom 15 in beiden Zelllinien. Insgesamt lagen mehr nichtklonale als klonale Aberrationen vor.

Da auch die meisten Subklone, die anhand charakteristischer Aberrationen definiert wurden, in nur 2 bis 3 von 30 Metaphasen auftraten, erscheint eine klare Trennung zwischen Subklonen und nichtklonalen Aberrationen nicht zwingend nötig und sinnvoll. So ist es wahrscheinlich, dass viele der vorhandenen nichtklonalen Aberrationen auch als Subklone definiert werden könnten, wenn eine höhere Anzahl an Metaphasen analysiert worden wäre.

Für die Entstehung nichtklonaler Aberrationen kommen sowohl Zellkultur-bedingte Einflüsse als auch tumorassoziierte Mechanismen in Frage, deren Trennung aber im Fall der vorliegenden *in vitro* kultivierten Tumorzelllinien kaum möglich ist. In vielen Tumoren treten nichtklonale Aberrationen weitaus häufiger auf als klonale Veränderungen. Ihre Häufigkeit korreliert mit dem Ausmaß der genetischen Instabilität und Heterogenität und kann mit der Malignität und Prognose eines Tumors assoziiert sein. Hinsichtlich ihres Auftretens wurden weiterhin gewebsspezifische Unterschiede festgestellt. In jedem Fall sollten nichtklonale Aberrationen in der zytogenetischen Beschreibung von Tumoren berücksichtigt werden (Heng et al. 2016). In dieser Arbeit wurden daher auch die Bruchpunkte nichtklonaler Aberrationen in die Gesamtdarstellung aufgenommen, falls sie sich in mcb und array-CGH exakt lokalisieren ließen.

Für das KRK ist die Erforschung nichtklonaler Aberrationen vergleichsweise unterrepräsentiert. Einige Studien deuten jedoch auf einen Bezug zur Resistenzbildung gegen Chemotherapeutika hin (Li et al. 2005).

5.2.4 Imbalancen und Bruchpunkte

Wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben, liegen für beide Zelllinien (mit Ausnahme der Gonosomen) ausschließlich Amplifikationen und keine Deletionen vor. Eine Diskussion dieses Befundes soll anhand der Translationsergebnisse erfolgen (siehe Kapitel 5.3.2).

Lediglich in einem Klon von CT26.WT fand sich eine Deletion des X-Chromosoms und für CMT-93 zeigte sich ein Verlust des Y-Chromosoms in einer Vielzahl von Metaphasen. Letzterer ist typisch sowohl für chemisch induzierte Darmtumoren als auch für das KRK, die tumorspezifische Bedeutung jedoch ist bislang unklar (Mertens et al. 1997, Guda et al. 2004).

Für CMT.93 konnten 17 und für CT26.WT 28 Bruchpunkte identifiziert werden. Diese Konstellation steht im Einklang mit den höheren Kopiezahlswankungen von CT26.WT und weist auf die höhere zytogenetische Instabilität dieser Zelllinie hin. Die Mehrzahl der Bruchpunkte (32) kam durch Translokation bzw. durch Bildung von Neozentromeren zustande. Hiervon waren 27 unbalanciert und nur 5 balanciert – ein Verhältnis, wie es auch für das KRK typisch ist (Knutsen et al. 2010). 10 Bruchpunkte waren auf die Bildung isodizentrischer Chromosomen und 3 auf Duplikationen zurückzuführen.

5.2.5 Polyploidisierung

In beiden Zelllinien wurde eine Neigung zur Polyploidisierung beobachtet. Hierbei handelte es sich in der Regel um eine exakte Verdoppelung des Chromosomensatzes. Vereinzelt traten auch höhere Ploidiegrade, bis hin zu Dodecaploidie auf. Der Anteil an polyploiden Metaphasen wurde anhand des mikroskopischen Bildes geschätzt und lag bei 6 bis 20 Prozent für CMT-93 und bei 20 bis 30 Prozent für CT26.WT. Ein solches Phänomen war auch bei anderen murinen Tumorzelllinien festzustellen, die in der Arbeitsgruppe für Molekulare Zytogenetik und in anderen Arbeitsgruppen (Levan und Biesele 1958) analysiert wurden.

Als Ursachen kommen prinzipiell tumorassoziierte Faktoren, wie die telomerbedingte Tetraploidisierung im Rahmen der Tumorprogression (Davoli und de Lange 2012), sowie Zellkultur-bedingte Faktoren in Betracht. Letztere können durch allgemeine Stressfaktoren wie die Trypsinbehandlung und Sauerstoffexposition sowie telomerbedingte und mitotische Störungen bedingt sein. Demensprechend vergrößert sich der Anteil an polyploiden Metaphasen mit zunehmender Anzahl an Zellkultur-Passagen (Mastromonaco et al. 2006). Die oben genannten Befunde sprechen eher für Zellkultur-bedingte als für tumorassoziierte Mechanismen der beobachteten Polyploidie. Da es sich in der Regel um exakte Vervielfachungen des Chromosomensatzes handelt, ist von keiner relevanten Beeinflussung der zytogenetischen Ergebnisse auszugehen.

5.2.6 Chromothripsis

Als Chromothripsis wird ein Ereignis bezeichnet, bei dem es in einer Zelle durch einen bestimmten Auslöser zu einer Vielzahl von Umlagerungen von Chromosomenabschnitten kommt. Chromosomen werden dabei in viele kleine Fragmente zerteilt und zu neuen, hochkomplexen Derivatchromosomen zusammengesetzt. Chromothripsis scheint an der Tumorprogression und Metastasierung beteiligt zu sein und könnte zur Verhinderung von Polyploidie beitragen (Rode et al. 2016). Für das primäre und metastasierte KRK ist Chromothripsis ein häufiges Phänomen, sie findet sich beispielsweise in etwa 50 Prozent der metastasierten Tumoren (Kloosterman et al. 2011, Skuja et al. 2017). Auch für einige murine Tumorzelllinien wurde Chromothripsis beschrieben (Guja et al. 2017).

Für CMT-93 fand sich Chromothripsis in etwa 1 Prozent der Metaphasen, während sie für CT26.WT nicht beobachtet wurde. Dies könnte die etwas niedrigeren Polyploidieraten von CMT-93 erklären und steht im Einklang mit dem fortgeschrittenen Tumorstadium dieser Zelllinie.

5.2.7 Isodizentrische Chromosomen

Für CMT-93 konnte 1 isodizentrisches Chromosom, für CT26.WT 12 isodizentrische Chromosomen festgestellt werden, die sowohl zwischen gleich- als auch verschiedenartigen Chromosomen auftraten. Weitere isodizentrische Chromosomen lagen als nichtklonale Aberrationen vor.

Für ihre Entstehung kommen mehrere Ursachen in Frage: das mausspezifische Robertson-Phänomen (siehe Kapitel 2.2.1), Einflüsse der Zellkultur analog zur Polyploidisierung (Mastromonaco et al. 2006) wie auch eine tumorassoziierte Häufung. So finden sich Isochromosomen auch im KRK als eine der häufigsten Aberrationen. Dem entsprechend liegt etwa ein Drittel der häufigsten Bruchpunkte beim KRK im Zentromer- oder Perizentromerbereich (Knutsen et al. 2010).

5.2.8 Neozentromere

Für CMT-93 fanden sich 4 Fälle, für CT26.WT 2 Fälle von Chromosomen, deren zentromertragender Anteil deletiert ist und es somit zur Neubildung eines Zentromers (Neozentromers) in untypischer Lokalisation kam. Sieht man von den deutlich kleineren Markerchromosomen ab, so sind solche Aberrationen für murine Tumorzelllinien eher untypisch und können somit als Charakteristikum für CMT-93 und CT26.WT herausgestellt werden. Ein Abgleich der jeweils amplifizierten Abschnitte mit den Genloci von typischen (Proto-)Onkogenen des KRK (siehe Kapitel 2.1.2) ergab keine Übereinstimmungen, sodass eine sichere Klärung der Funktion bislang nicht möglich ist.

Neozentromere sind in einzelnen Fällen auch für Tumoren des Menschen beschrieben, wobei angenommen wird, dass aufgrund der selten durchgeführten Karyotypisierung ihr Auftreten deutlich häufiger ist. Ihre Bedeutung für die Tumorgenetik ist weitgehend unklar. Offenbar dienen sie zur Stabilisierung amplifizierter Chromosomenabschnitte und Markerchromosomen (Marshall et al. 2008).

5.2.9 Markerchromosomen

Als Markerchromosomen werden kleine zusätzliche Chromosomen bezeichnet. Für CT26.WT fanden sich 1 bis 3 Markerchromosomen pro Metaphase. Da eine Identifizierung im mcb nicht möglich war, bleibt ihre chromosomale Zuordnung unbekannt. Auch eine sichere Charakterisierung als sogenannte Double Minutes, welche in Tumoren häufig anzutreffen sind, war nicht möglich. Zu vermuten ist allerdings eine ähnliche Funktion wie für die Chromosomenabschnitte mit Neozentromeren.

5.3 In-silico-Translation

5.3.1 Literaturvergleich der Bruchpunkte

Im Rahmen eines zytogenetischen Vergleichs humaner Darmtumorzelllinien mit klinischen Proben lieferten Knutsen et al. (2010) eine Zusammenstellung der 50 häufigsten chromosomalen Bruchpunkte aus 345 Proben intestinaler Adenokarzinome des Mitelman-Katalogs, einer der umfassendsten tumorgenetischen Datenbanken (Knutsen et al. 2010, Mitelman et al. 2017). Die einzelnen Häufigkeiten dieser 50 Bruchpunkte liegen bei lediglich 2 bis 14 Prozent, worin sich die hohe zytogenetische Diversität des KRK widerspiegelt. Weiterhin auffallend ist die hohe Zahl von Bruchpunkten in Zentromerregionen. Diese umfassen einen Anteil von etwa 50 % der häufigsten Bruchpunkte und treten bei der Bildung isodizentrischer Chromosomen auf.

In Tab. 5 werden die ermittelten und translatierten Bruchpunkte beider Zelllinien auf Übereinstimmung mit den oben genannten Angaben geprüft. Hierbei werden die Bruchpunkte in Zentromerbereichen gesondert gekennzeichnet, da sich ihre Lokalisation im murinen und humanen Genom größtenteils unterscheidet und sie damit nicht direkt vergleichbar sind.

Zusammenfassend zeigt sich eine geringe Übereinstimmung der Bruchpunkte beider Zelllinien mit den häufigsten Bruchpunkten des KRK. Erklärbar ist dies durch die bereits genannte Heterogenität von Bruchereignissen dieser Tumorentität, die hohe Zahl isodizentrischer Chromosomen (Knutsen et al. 2010) sowie den wahrscheinlich abweichenden Bruchpunktlokalisationen von chemisch induzierten und spontan auftretenden Tumoren (Gebhart 1977).

Tab. 5: Ermittelte Bruchpunkte und ihre Übereinstimmung mit den 50 häufigsten Bruchpunkten des KRK (Knutsen et al. 2010). * = Bruchpunkte in Zentromerbereichen des Mausgenoms, x = exakte Übereinstimmung, (x) = geringfügige Abweichung auf Zytobanden-Niveau.

| CMT-93 | |
|------------|-----------------|
| Bruchpunkt | Übereinstimmung |
| 1p31.3 | (x) |
| 1p35.3 | (x) |
| 2q24.3 | |
| 3p14.2* | |
| 4p12 | |
| 4q34.2 | |
| 5p14.1* | |
| 6p21.1 | |
| 11p15.4 | |
| 11p15.5 | |
| 16q21 | |
| 16q22.1 | |
| 19p13.13 | x |
| 20p12.1 | (x) |
| 22q13.2 | |
| Xp22.2 | |
| Xq25 | |
| Summe | 1 (4) |

| CT26.WT | |
|--------------|-----------------|
| Bruchpunkt | Übereinstimmung |
| 1p13.3 | x |
| 2p24.2* | |
| 2q24.3 | |
| 3p14.2* | |
| 3q25.32 | |
| 4p12 | |
| 4p16.3-q22.1 | |
| 5p14.1* | |
| 5q14.3 | |
| 5q23.2 | |
| 6p24.3 | |
| 6q14.1 | (x) |
| 6q25.3* | |
| 7q21.11* | |
| 7q21.3* | |
| 7q34 | |
| 8q11.3* | |
| 8q21.13* | |
| 9q21.13 | (x) |
| 10p15.2* | |
| 10q24.32 | x |
| 12p12.2 | |
| 12q12 | (x) |
| 12q23.3 | (x) |
| 15q25.3 | |
| 20q13.12 | |
| Xq25 | |
| Xq27.1-q27.2 | |
| Summe | 2 (6) |

5.3.2 Literaturvergleich der Imbalancen

Zur Identifizierung stadienspezifischer chromosomaler Imbalancen des KRK führten Diep et al. (2006) eine Metaanalyse aus 30 Publikationen mit CGH-Ergebnissen von 720 nicht-metastasierten Primärtumoren und 139 Lebermetastasen durch. Dabei lieferten sie eine Übersicht der prozentualen Häufigkeiten von Zugewinnen und Verlusten auf Zytobanden-Niveau (ohne Berücksichtigung von Subbanden). Nicht einbezogen wurden die akrozentrischen Chromosomenarme 13p, 14p, 15p, 21p und 22p, welche lange repetitive Sequenzen aufweisen und somit unzuverlässige Ergebnisse zeigen (Diep et al. 2006). Da sich

in keiner der untersuchten Zelllinien für diese Chromosomenabschnitte Imbalancen fanden, bleiben sie im vorliegenden Vergleich ebenfalls unberücksichtigt. Separat zu behandeln ist gleichfalls das Y-Chromosom (siehe Kapitel 5.2.4). Für lymphatisch metastasierende Tumoren bzw. Lymphknotenmetastasen fanden Knösel et al. (2004) nur sehr wenige zusätzliche Imbalancen im Vergleich zu Primärtumoren, beispielsweise die Deletion von Chromosom 18 und 21q (Knösel et al. 2004). Sie bleiben daher im vorliegenden Vergleich ebenfalls unberücksichtigt. In Tab. 6 werden die häufigsten Amplifikationen beim KRK auf Übereinstimmung mit den Amplifikationen beider Zelllinien überprüft. Eine umgekehrte Darstellung findet sich in Tab. 12 auf Seite 83.

Tab. 6: Amplifikationen des KRK und ihre Übereinstimmung in beiden Zelllinien. x = vollständige Überlappung, (x) = teilweise Überlappung.

| Amplifikationen in >15 % der KRK (Diep et al. 2006) | | CMT-93 | CT26.WT |
|---|----------------|--------|---------|
| Primärtumor | Lebermetastase | | |
| | 1q21-q41 | (x) | x |
| | 6p11-p25 | (x) | (x) |
| | 6q12 | | x |
| | 6q21 | | |
| 7p22-q36 | | (x) | (x) |
| | 8p11-p12 | x | x |
| 8q11-q24 | | (x) | x |
| | 11p15 | | x |
| | 11q13 | x | x |
| | 12p13-q13 | (x) | (x) |
| 13q11-q34 | | (x) | (x) |
| | 16p13-q24 | (x) | (x) |
| | 17q11-q25 | x | |
| | 19p13 | x | x |
| | 19q13 | x | x |
| 20p13-q13 | | x | x |
| | Xp22 | | |
| Xp21-q25 | | (x) | |
| | Xq26-q28 | (x) | |
| Summe | | 6 (15) | 9 (14) |

Wie bereits in Kapitel 5.2.4 erwähnt, finden sich in beiden Zelllinien (mit Ausnahme der Gonosomen) nur Amplifikationen und keine Deletionen. Demgegenüber zeigt das KRK eine Reihe typischer Deletionen (Diep et al. 2006). Eine Analyse für die Genloci wichtiger Tumorsuppressorgene, für die eine Deletion im Allgemeinen zu erwarten wäre, ist in Tab. 7 dargestellt. Demnach zeichnet sich kein einheitliches Bild ab und es ist sowohl für das KRK

als auch die untersuchten Zelllinien zu vermuten, dass die Inaktivierung vieler Tumorsuppressorgene durch Mutationen oder komplexe Wechselwirkungen der beteiligten Signalwege zustande kommt (Marmol et al. 2017). Zu ähnlichen Schlussfolgerungen gelangten auch Wlochowicz et al. (2016) in ihrer Analyse für die Genregulation von CMT-93 (Wlochowicz et al. 2016).

Tab. 7: Wichtige Tumorsuppressorgene des KRK und ihre Deletion oder Amplifikation im KRK sowie in beiden untersuchten Zelllinien

| Tumorsuppressorgen | Genlocus | Deletion oder Amplifikation | | |
|--------------------|----------|---|--------------|--------------|
| | | KRK in >15 % d.F. (Diep et al. 2006) | CMT-93 | CT26.WT |
| <i>PI3CA</i> | 3q26.32 | – | amplifiziert | amplifiziert |
| <i>APC</i> | 5q22.2 | deletiert | – | amplifiziert |
| <i>BRAF</i> | 7q34 | amplifiziert | amplifiziert | amplifiziert |
| <i>CDKN2A</i> | 9p21.3 | deletiert in Lebermetastasen | – | – |
| <i>TP53</i> | 17p13.1 | deletiert | amplifiziert | – |

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass beide Zelllinien hohe Übereinstimmungen ihrer Amplifikationen mit denen des metastasierten KRK aufweisen und in dieser Hinsicht als Modellsystem für das KRK, insbesondere für fortgeschrittene Tumorstadien, geeignet erscheinen. Unberücksichtigt bleiben müssen jedoch die Deletionen, da für die Inaktivierung der relevanten Gene im KRK offenbar weitere Mechanismen verantwortlich sind.

6 Ausblick

Wie auch in früheren Arbeiten (Leibiger et al. 2013, Kubicova et al. 2017, Guja et al. 2017) konnte die zytogenetische Vergleichbarkeit der untersuchten Tumorzelllinien mit ihrem humanen Pendant aufgezeigt werden. Daher wären molekular-zytogenetische Untersuchungen an weiteren murinen Tumorzelllinien wünschenswert, um ihre Eignung oder Nichteignung als Modellsystem für humane Tumoren herauszustellen.

Weitere Ansatzpunkte für zukünftige Forschungen ergeben sich beispielsweise aus der begrenzten Auflösungsrate des mcb. Für Imbalancen mit einer Größe von weniger als 3,5 Megabasenpaaren könnten lokusspezifische Sonden entwickelt und eingesetzt werden und dadurch die Genauigkeit der Bruchpunktanalyse erhöht werden. Weiterhin wäre ein detaillierter Vergleich mit den Ergebnissen der Sequenzierung (wie sie für CT26.WT bereits vorliegen) wünschenswert. Hierdurch könnten die Stärken beider Methoden (Aussagen über (klonale) Kopiezahlveränderungen im mcb, höhere Auflösungsraten und Detektion von Mutationen in der Sequenzierung) kombiniert werden. Auch Genexpressionsprofile und epigenetische Veränderungen sollten im Rahmen einer Gesamtdarstellung größere Beachtung finden.

Auf die Bedeutung nichtklonaler Aberrationen wurde in Kapitel 5.2.3 bereits eingegangen. Ihre Häufigkeit korreliert nicht nur mit der tumorgenetischen Stabilität, sie besitzt auch klinische Relevanz im Rahmen der Resistenzbildung gegenüber medikamentöser Therapien und könnte perspektivisch als Marker für die klinische Prognose dienen (Li et al. 2005, Heng et al. 2016). Für das KRK sind solche Untersuchungen derzeit noch unterrepräsentiert. Zukünftig könnten CMT-93 und CT26.WT als Modellsystem genutzt werden, um das Auftreten nichtklonaler Aberrationen in einer größeren Zahl von Metaphasen molekular-zytogenetisch zu untersuchen.

CMT-93 und CT26.WT zeigen als einzige der bislang untersuchten murinen Tumorzelllinien die Bildung von Neozentromeren. Weitere Untersuchungen, beispielsweise durch lokusspezifische FISH-Sonden, könnten die Bedeutung dieses Ergebnisses näher herauszustellen.

7 Literaturverzeichnis

- Bayani J, Squire JA. 2004. Traditional banding of chromosomes for cytogenetic analysis. Curr Protoc Cell Biol, Chapter 22:Unit 22 23.
- Bint SM, Davies AF, Ogilvie CM. 2013. Multicolor banding remains an important adjunct to array CGH and conventional karyotyping. Mol Cytogenet, 6 (1):55.
- Carver BS, Pandolfi PP. 2006. Mouse modeling in oncologic preclinical and translational research. Clin Cancer Res, 12 (18):5305-5311.
- Castle JC, Loewer M, Boegel S, de Graaf J, Bender C, Tadmor AD, Boisguerin V, Bukur T, Sorn P, Paret C, Diken M, Kreiter S, Tureci O, Sahin U. 2014. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. BMC Genomics, 15:190.
- Cho EK, Tchinda J, Freeman JL, Chung YJ, Cai WW, Lee C. 2006. Array-based comparative genomic hybridization and copy number variation in cancer research. Cytogenet Genome Res, 115 (3-4):262-272.
- Chudoba I, Plesch A, Lorch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. 1999. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. Cytogenet Cell Genet, 84 (3-4):156-160.
- Chung YJ, Jonkers J, Kitson H, Fiegler H, Humphray S, Scott C, Hunt S, Yu Y, Nishijima I, Velds A, Holstege H, Carter N, Bradley A. 2004. A whole-genome mouse BAC microarray with 1-Mb resolution for analysis of DNA copy number changes by array comparative genomic hybridization. Genome Res, 14 (1):188-196.
- Claussen U, Michel S, Muhlig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T. 2002. Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. Cytogenet Genome Res, 98 (2-3):136-146.
- Davoli T, de Lange T. 2012. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. Cancer Cell, 21 (6):765-776.
- De Robertis M, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, Cecchetelli L, Signori E, Fazio VM. 2011. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. J Carcinog, 10:9.
- Diep C, Kleivi K, Ribeiro F, Teixeira M, Lindgjaerde O, Lothe R. 2006. The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. Genes, Chromosomes and Cancer, 45:31-41.

- Evans JP, Sutton PA, Winiarski BK, Fenwick SW, Malik HZ, Vimalachandran D, Tweedle EM, Costello E, Palmer DH, Park BK, Kitteringham NR. 2016. From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Crit Rev Oncol Hematol*, 98:94-105.
- Franks LM, Hemmings VJ. 1978. A cell line from an induced carcinoma of mouse rectum. *J Pathol*, 124 (1):35-38.
- Garagna S, Page J, Fernandez-Donoso R, Zuccotti M, Searle JB. 2014. The Robertsonian phenomenon in the house mouse: mutation, meiosis and speciation. *Chromosoma*, 123 (6):529-544.
- Gebhart E. 1977. Chemische Mutagenese. Erbgutschädigende Wirkung von Chemikalien unter besonderer Berücksichtigung von Arzneimitteln, Nahrungsmittelbestandteilen, Genussmitteln und Umweltschadstoffen. Stuttgart/New York: G. Fischer.
- Golovko D, Kedrin D, Yilmaz OH, Roper J. 2015. Colorectal cancer models for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 10 (11):1217-1229.
- Gordon J, Fischer-Carlidge E, Barton-Burke M. 2017. The Big 3: An Updated Overview of Colorectal, Breast, and Prostate Cancers. *Nurs Clin North Am*, 52 (1):27-52.
- Grade M, Becker H, Liersch T, Ried T, Ghadimi BM. 2006. Molecular cytogenetics: genomic imbalances in colorectal cancer and their clinical impact. *Cell Oncol*, 28 (3):71-84.
- Griswold DP, Corbett TH. 1975. A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer*, 36 (6 Suppl):2441-2444.
- Guda K, Upender MB, Belinsky G, Flynn C, Nakanishi M, Marino JN, Ried T, Rosenberg DW. 2004. Carcinogen-induced colon tumors in mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability. *Oncogene*, 23 (21):3813-3821.
- Guja K, Liehr T, Rincic M, Kosyakova N, Hussein Azawi SS. 2017. Molecular Cytogenetic Characterization Identified the Murine B-Cell Lymphoma Cell Line A-20 as a Model for Sporadic Burkitt's Lymphoma. *J Histochem Cytochem*:22155417731319.
- Heng HH, Regan SM, Liu G, Ye CJ. 2016. Why it is crucial to analyze non clonal chromosome aberrations or NCCAs? *Mol Cytogenet*, 9:15.
- Kearney L. 2006. Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. *Cytogenet Genome Res*, 114 (3-4):189-198.
- Kloosterman WP, Hoogstraat M, Paling O, Tavakoli-Yaraki M, Renkens I, Vermaat JS, van Roosmalen MJ, van Lieshout S, Nijman IJ, Roessingh W, van 't Slot R, van de Belt J, Guryev V, Koudijs M, Voest E, Cuppen E. 2011. Chromothripsis is a common mechanism driving genomic rearrangements in primary and metastatic colorectal cancer. *Genome Biol*, 12 (10):R103.

- Knösel T, Schluns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. 2004. Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia*, 6 (1):23-28.
- Knutsen T, Padilla-Nash HM, Wangsa D, Barenboim-Stapleton L, Camps J, McNeil N, Difilippantonio MJ, Ried T. 2010. Definitive molecular cytogenetic characterization of 15 colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 49 (3):204-223.
- Kosyakova N, Trifonov V, Romanenko S, Mkrtchyan H, Graphodatsky A, Liehr T. 2013a. Murine multicolor banding. *Tsitologiya*, 55 (4):259-260.
- Kosyakova N, Hamid AB, Chaveerach A, Pinthong K, Siripiyasing P, Supiwong W, Romanenko S, Trifonov V, Fan X. 2013b. Generation of multicolor banding probes for chromosomes of different species. *Mol Cytogenet*, 6 (1):6.
- Kubicova E, Trifonov V, Borovecki F, Liehr T, Rincic M, Kosyakova N, Hussein SS. 2017. First Molecular Cytogenetic Characterization of Murine Malignant Mesothelioma Cell Line AE17 and In Silico Translation to the Human Genome. *Current Bioinformatics*, 12 (1):11-18.
- Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, Fletcher JA, Morton CC. 2001. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet*, 68 (4):1043-1047.
- Leibiger C, Kosyakova N, Mkrtchyan H, Gleis M, Trifonov V, Liehr T. 2013. First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. *J Histochem Cytochem*, 61 (4):306-312.
- Levan A, Bieseke JJ. 1958. Role of chromosomes in cancerogenesis, as studied in serial tissue culture of mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci*, 71 (6):1022-1053.
- Li R, Hehlman R, Sachs R, Duesberg P. 2005. Chromosomal alterations cause the high rates and wide ranges of drug resistance in cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 163 (1):44-56.
- Liehr T. 2014. Bedeutung von Zellmosaiken in der genetischen Diagnostik. *Medgen*, 26:297.
- Liehr T. 2017. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Application Guide. 2 Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Lobo I. 2008. Chromosome Abnormalities and Cancer Cytogenetics. *Nature Education*, 1 (1):68.
- Lu YJ, Morris JS, Edwards PA, Shipley J. 2000. Evaluation of 24-color multifluor-fluorescence in-situ hybridization (M-FISH) karyotyping by comparison with reverse chromosome painting of the human breast cancer cell line T-47D. *Chromosome Res*, 8 (2):127-132.

- Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. 2017. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 18 (1).
- Marshall OJ, Chueh AC, Wong LH, Choo KH. 2008. Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *Am J Hum Genet*, 82 (2):261-282.
- Mastromonaco GF, Perrault SD, Betts DH, King WA. 2006. Role of chromosome stability and telomere length in the production of viable cell lines for somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev Biol*, 6:41.
- McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. 2016. ISCN 2016. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016). Basel: S. Karger AG.
- Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F. 1997. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res*, 57 (13):2765-2780.
- Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppede F. 2011. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol*, 2011:792362.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. 2017. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. 2016. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 469 (2):125-134.
- Muzny D, Bainbridge M, Chang K, ..., Thomson E. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Cancer Genome Atlas Network. Nature*, 487(7407):330-7.
- O'Brien SJ, Menninger JC, Nash WG. 2006. *Atlas of Mammalian Chromosomes*. Hoboken NJ: John Wiley & Sons.
- Rode A, Maass KK, Willmund KV, Lichter P, Ernst A. 2016. Chromothripsis in cancer cells: An update. *Int J Cancer*, 138 (10):2322-2333.
- Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, Garcia-Albeniz X, Maurel J, Batlle JF. 2017. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol*, 109:9-19.
- Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. 2009. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 30 (2):183-196.
- Schröck E, Zscheschang P, O'Brien P, Helmrich A, Hardt T, Matthaei A, Stout-Weider K. 2006. Spectral karyotyping of human, mouse, rat and ape chromosomes--applications for genetic diagnostics and research. *Cytogenet Genome Res*, 114 (3-4):199-221.

- Shiller M, Boostrom S. 2015. The molecular basis of rectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg*, 28 (1):53-60.
- Skuja E, Kalniete D, Nakazawa-Miklasevica M, Daneberga Z, Abolins A, Purkalne G, Miklasevics E. 2017. Chromothripsis and progression-free survival in metastatic colorectal cancer. *Mol Clin Oncol*, 6 (2):182-186.
- Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. 2007. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol*, 170 (3):793-804.
- Tong Y, Yang W, Koeffler HP. 2011. Mouse models of colorectal cancer. *Chin J Cancer*, 30 (7):450-462.
- Wang M, Bronte V, Chen PW, Gritz L, Panicali D, Rosenberg SA, Restifo NP. 1995. Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. *J Immunol*, 154 (9):4685-4692.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, ..., Lander ES. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420 (6915):520-562.
- Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, Liehr T, Kosyakova N. 2008. Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *J Histochem Cytochem*, 56 (5):487-493.
- Wlochowicz D, Haubrock M, Arackal J, Bleckmann A, Wolff A, Beissbarth T, Wingender E, Gultas M. 2016. Computational Identification of Key Regulators in Two Different Colorectal Cancer Cell Lines. *Front Genet*, 7:42.
- Zornig M, Klett C, Lovéc H, Hameister H, Winking H, Adolph S, Moroy T. 1995. Establishment of permanent wild-mouse cell lines with readily identifiable marker chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 71 (1):37-40.

Anhang

Tab. 8: mFISH-Ergebnisse für CMT-93 (Anmerkung: die Kopiezahlen der isozentrischen Chromosomen sind bei den zugehörigen Einzelchromosomen zusätzlich berücksichtigt)

| | Chromosomenzahl | 1 | 2 | neo(2) | der(2)t(2;5) | 3 | 4 | 5 | del(5) | 6 | 7 | 8 | der(8)t(2;8) | neo(8){:neo->B1->qter} | neo(8){:neo->C2->qter} | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | idic(14;15) | | | | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | X | der(X) | Y | mar | nichtklonale Aberrationen |
|---|-----------------|---|---|--------|--------------|---|---|---|--------|---|---|---|--------------|------------------------|------------------------|---|----|----|----|----|----|-------------|---|---|---|----|----|----|----|----|-------------------|-------------------------|--|--------|---------------------------|
| 1 | 48 | 1 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 2 | | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 4 | 1 | | | | | | del(1) | |
| | 54 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 2 | | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 1 | | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 1 | | 1 | 1 | | | | |
| | 56 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 2 | | 1 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 1 | | | | 1 | del(11) | | |
| | 51 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 2 | | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 4 | 1 | | 1 | 1 | | | | |
| | 50 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 4 | 2 | 2 | | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 4 | 1 | | | 1 | | | | |
| | 50 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 4 | 1 | | | 1 | idic(11;14) | | | |
| | 50 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 2 | | 3 | 3 | 2 | | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | | 2 | idic(10), dup(18) | | | | |
| | 51 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 1 | | 1 | | | | | |
| | 48 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 2 | | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 4 | 1 | | 1 | | | | | |
| | 56 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 2 | | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 1 | | 1 | 1 | | | | |
| | 53 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 1 | | 1 | | | | | |
| | 52 | 2 | 2 | 2 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 1 | | 1 | | | | | |
| | 47 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 2 | | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 4 | 1 | | | | | | | |
| | 49 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 3 | 2 | | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 | 2 | 4 | 1 | | 1 | del(4) | | | | |
| | 96 | 4 | 4 | 2 | | 6 | 4 | 6 | | 6 | 4 | 4 | | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 4 | 4 | 8 | 2 | | 2 | | | | | |
| | 104 | 4 | 4 | 2 | | 6 | 4 | 6 | | 8 | 4 | 4 | | 2 | 2 | 4 | 4 | 6 | 4 | 6 | 4 | 2 | 6 | 4 | 6 | 6 | 8 | 2 | | 2 | 1 | | | | |
| 2 | 52 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | | 1 | | del(11), idic(19) | | |
| | 53 | 2 | 2 | 1 | | 2 | 2 | 2 | | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | | | 2 | | der(3)t(3;16), der(6)t(6;17), der(11)t(11,15), del(16), del(X) | | |
| | 52 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | | | 1 | | | | |
| | 54 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 2 | | 1 | 1 | | | | |
| | 49 | 2 | 2 | 1 | | 2 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | | 1 | | der(11)t(3;11), dup(16) | | | |
| | 54 | 2 | 1 | 1 | | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 1 | | 1 | 1 | der(1)t(1;15), del(18) | | | |
| | 53 | 2 | 1 | 1 | | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 1 | | 1 | 1 | | | | |
| | 52 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | | 1 | 1 | 1 | | | | |
| | 51 | 2 | 2 | 1 | | 4 | 2 | 2 | | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | | 1 | 1 | 1 | | | | |
| | 52 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 4 | | 1 | 1 | | | | | |
| | 53 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | | 1 | 1 | 1 | | | | |
| | 51 | 2 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 3 | | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | | 1 | 1 | 1 | | | | |
| | 102 | 4 | 4 | 2 | | 6 | 4 | 6 | | 6 | 4 | 6 | 2 | 2 | 4 | 4 | 6 | 6 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 6 | 4 | 6 | 4 | 6 | | 2 | 2 | | | | |
| | 107 | 4 | 4 | 2 | | 6 | 4 | 6 | | 6 | 6 | 6 | 2 | 2 | 4 | 4 | 6 | 6 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | | 2 | 2 | 2 | | | | |

Tab. 9: mFISH-Ergebnisse für CT26.WT (Anmerkung: die Kopiezahlen der isodizentrischen Chromosomen sind bei den zugehörigen Einzelchromosomen zusätzlich berücksichtigt)

| Klon | Chromosomenzahl | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | idic(5) | idic(5;15) | idic(5;19) | 6 | der(6)t(3;6;10) | der(6)t(6;10) | 7 | der(7)t(7;19) | 8 | 9 | der(9)t(2;9) | 10 | 11 | 12 | idic(12) | idic(12;X) | 13 | idic(13) | neo(13) | 14 | idic(14) | 15 | 16 | 17 | 18 | dup(18) | 19 | X | mar | nichtklonale Aberrationen | | | |
|------|-----------------|---|---|---|---|---|---------|------------|------------|---|-----------------|---------------|---|---------------|---|---|--------------|----|----|----|----------|------------|----|----------|---------|----|----------|----|----|----|----|---------|----|---|-----|---------------------------|-----------------|---------|--|
| 1 | 60 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 3 | 4 | 2 | | der(17)t(15;17) | | | |
| | 59 | 3 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | | | | |
| | 61 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 5 | 3 | 4 | 2 | 2 | | | | |
| | 60 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | | | | | |
| 1a | 62 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | | |
| | 63 | 4 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | | |
| | 63 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 5 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | | | |
| | 62 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | | |
| | 63 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 4 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 1 | 3 | 2 | 3 | | | |
| | 119 | 6 | 2 | 6 | 2 | 4 | 2 | 6 | 6 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 6 | 2 | 7 | 4 | 2 | 5 | 8 | 6 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 8 | 6 | 8 | 6 | 2 | 6 | 4 | 3 | | |
| | 118 | 6 | 2 | 6 | 2 | 4 | 2 | 6 | 6 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 6 | 2 | 7 | 4 | 2 | 5 | 6 | 6 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 8 | 6 | 8 | 6 | 2 | 6 | 4 | 3 | | |
| | 121 | 8 | 2 | 6 | 2 | 4 | 2 | 6 | 6 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 6 | 2 | 8 | 4 | 2 | 6 | 6 | 6 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 8 | 6 | 8 | 6 | 2 | 8 | 4 | 3 | | |
| | 63 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 5 | | |
| | 60 | 3 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 1 | | | |
| | 59 | 3 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | der(17)t(15;17) | | |
| 2 | 64 | 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 3 | | | | |
| | 62 | 5 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 4 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | | |
| | 62 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 2 | | | | |
| | 60 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 3 | | | |
| 2a | 60 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 3 | idic(15) | | |
| | 61 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 1 | 4 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 2 | idic(9) | |
| 2b | 61 | 4 | 1 | 4 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | | |
| | 62 | 4 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 4 | 2 | 1 | 4 | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | | |
| 2c | 59 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 2 | 4 | 2 | 1 | | | |
| | 57 | 3 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | |
| | 63 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 3 | | | |
| 2d | 61 | 4 | 1 | 4 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | |
| | 61 | 4 | 1 | 4 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | |
| | 58 | 3 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | |
| 2e | 63 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 5 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | 4 | 2 | 3 | | |
| | 60 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 4 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | | |

Tab. 10: Nichtklonale strukturelle Aberrationen in der mcb-Analyse von CMT-93

| mcb | nichtklonale strukturelle Aberrationen (N = normales Chromosom) | Anzahl der Metaphasen (von insges. 30) | evtl. korrespondierende nichtklonale Aberrationen in der mFISH-Analyse (vergleiche Tab. 8) |
|-----|---|---|---|
| 3 | 2xN + der(3)(:D→A1::A1→F2:) | 1 | |
| 4 | 1xN + neo(4)(:neo→B1→E2:) | 1 | del(4) |
| 5 | 2xN + der(5)t(5;?)(5A1→5F::?) + neo(5)(:neo→F→G3:) | 1 | |
| 7 | 1xN + neo(7)(:neo→A1→E1:) + neo(7)(:neo→E2→qter) | 1 | |
| 7 | 1xN + der(7)t(7;?)(7A1→7qter::?) | 1 | |
| 11 | der(11)(A1→E2::E2→A1) + 2xder(11)t(11;?)(11A1→11B1::?) + 2xder(?)t(?;11)(?::11B5→11A1) + 4xneo(11)(:neo→B4→E2) | 1 | del(11) der(11)t(3;11) der(11)t(11;15) |
| 15 | 3xN + 2xder(15)t(15;?)(15A1→15D3::?) | 1 | |
| 15 | 2xN + der(15)t(15;?)(15A1→15D3::?) + neo(15)(:neo→F1→qter) | 1 | |
| 15 | 2xN + 2xidic(14;15) + 2xder(15)t(15;?)(15A1→15D3::?) | 2 | |
| 15 | 1xN + der(15)t(15;?)(15A1→15D3::?) + der(?)t(?;15)(?::15E1→15qter) | 1 | der(1)t(1;15) |
| 15 | 1xN + idic(14;15) + der(15)t(15;?)(15A1→15D3::?) + der(?)t(?;15)(?::15E1→15qter) | 1 | der(1)t(1;15) |
| 16 | 3xN + del(16)(A→B5:) | 1 | |
| 17 | 1xN + del(17)(A1→B:) + der(?)t(?;17)(?::17C→17qter) | 1 | der(6)t(6;17) |
| 17 | 2xN + del(17)(A1→B:) + der(?)t(?;17)(?::17C→17qter) | 2 | der(6)t(6;17) |
| 19 | 3xN + der(?)t(?;19)(?::19A1→19qter) | 1 | |
| X | der(X)t(X;?) (Xqter→XA1:cen:XA1→Xqter::?) | 1 (nahe- diploid) | |

Tab. 11: Nichtklonale strukturelle Aberrationen in der mcb-Analyse von CT26.WT

| mcb | nichtklonale strukturelle Aberrationen (N = normales Chromosom) | Anzahl der Metaphasen (von insges. 30) | evtl. korrespondierende nichtklonale Aberrationen in der mFISH-Analyse (vergleiche Tab. 9) |
|-----|--|---|--|
| 4 | 3xN + neo(4)(:C6->C7:) | 1 | |
| 4 | 5xN + neo(4)(:C6->C7:) | 1 | |
| 7 | 3xN + 2xdel(7)(A1->B5:) | 1 | |
| 8 | 3xN + der(8)t(8;?)(8A1->8qter::?) | 2 | |
| 15 | 3xN + idic(5;15) + der(?)t(?;15)(?::15F1->15qter) | 1 | der(17)t(15;17) |
| 15 | 3xN + idic(5;15) + der(3) + der(?)t(?;15)(?::15F1->15qter) | 1 | der(17)t(15;17) |
| 15 | 2xN + idic(5;15) + der(?)t(?;15)(?::15A1->15qter) + 2xder(?)t(?;15)(?::15F1->15qter) | 1 | der(17)t(15;17) |
| 17 | 2xN + idic(13;17) + der(17)t(17;?)(17A1->17E4~17qter::?) | 2 | der(17)t(15;17) |
| 17 | 2xN + idic(13;17) + del(17)(A1->A3:) | 1 | |
| 19 | 3xN + idic(5;19) + der(7) + der(19)t(19;?)(19A1->19C2::?) | 1 | |
| 19 | 3xN + idic(5;19) + der(7) + der(19)t(19;?)(19A1->19C2::?) + der(?)t(?;19)(?::19A1->19C2) | 1 | |
| X | 2xN + r(X)(::A1->C::C->A1::) (Anmerkung: Ringchromosom) | 1 | |

Tab. 12: Zugewinne beider Zelllinien und ihre Übereinstimmung mit den häufigsten Amplifikationen im KRK. x = vollständige Überlappung, (x) = teilweise Überlappung.

| Zugewinne von CMT-93 | Amplifikation in >15 % der KRK (Diep et al. 2006) | |
|----------------------|---|-----------------|
| | Primärtumor | Leber-metastase |
| 1p11.2-p31.3 | | |
| 1p32.1-p36.33 | | |
| 1q21.1-q23.1 | | x |
| 1q42.13-q42.3 | | |
| 2p11.2-ptr | | |
| 2q11.1-q11.2 | | |
| 2q12.3-q14.1 | | |
| 3p12.3-p14.1 | | |
| 3p24.3 | | |
| 3p25.1-ptr | | |
| 3q21.3-q22.1 | | |
| 3q24-q27.1 | | |
| 4p16.3-q31.1 | | |
| 4q31.3-qtr | | |
| 5p12-p15.31 | | |
| 5q15-q22.1 | | |
| 5q23.3-q35.3 | | |
| 6p12.3-p22.1 | | x |
| 6q25.2-q27 | | |
| 7p11.2-p12.3 | | |
| 7p15.3-p22.3 | (x) | (x) |
| 7q11.21-q36.3 | | |
| 8p11.21-p12 | | x |
| 8p21.3-p22 | | |
| 8p22.3-p23.3 | | |
| 8q12.3-q21.3 | (x) | (x) |
| 8q22.1-q24.3 | x | x |
| 9p11.2-p12 | | |
| 9p24.1-ptr | | |
| 9q13 | | |
| 9q21.11-21.31 | | |
| 10p11.21-p11.22 | | |
| 10q11.21-q21.1 | | |
| 10q22.1-q26.11 | | |
| 11p11.2-p14.2 | | |
| 11q12.1-q13.3 | | x |
| 12p11.1 | | |
| 12p11.21-p13.33 | | x |
| 12q12-q13.2 | | x |
| 12q23.11-q24.33 | | |

| Zugewinne von CT26.WT | Amplifikation in >15 % der KRK (Diep et al. 2006) | |
|-----------------------|---|-----------------|
| | Primärtumor | Leber-metastase |
| 1p11.2-p31.1 | | |
| 1q21-q44 | | x |
| 2p11.2-p13.3 | | |
| 2p16.2-p23.2 | | |
| 2q11.1-q22.1 | | |
| 2q32.2-qtr | | |
| 3p12.3-p14.1 | | |
| 3p24.3-ptr | | |
| 3q21.3-q22.1 | | |
| 3q25.1-q26.2 | | |
| 4p16.3-q27 | | |
| 4q31.1-qtr | | |
| 5p12-p15.33 | | |
| 5q14.3-q31.2 | | |
| 5q35.1-q35.3 | | |
| 6p22.3-ptr | | (x) |
| 6p22.1-q13 | | (x) |
| 6q25.2-q27 | | |
| 7p11.2 | | x |
| 7p14.3-p15.3 | | x |
| 7p21.3-ptr | x | x |
| 7q11.21-q11.23 | | x |
| 7q21.2-q22.1 | | x |
| 7q31.1-q36.1 | | x |
| 8p11.21-p12 | | x |
| 8p21.3-p23.3 | | |
| 8q11.21-q12.1 | x | x |
| 8q12.2-q21.13 | x | x |
| 8q22.1-qtr | x | x |
| 9p11.1-9p13 | | |
| 9q21.11-q22.33 | | |
| 10p11.21-p11.22 | | |
| 10q11.21-q11.22 | | |
| 10q23.2-q26.11 | | |
| 11p14.3-p15.1 | | (x) |
| 11q11.12-q13.3 | | x |
| 12p11.1-p13.33 | | x |
| 12q12-q24.33 | | (x) |
| 13q12.11 | x | x |
| 13q12.13-q13.2 | x | x |

| Zugewinne von CMT-93 (Fortsetzung) | Amplifikation in >15 % der KRK (Diep et al. 2006) | |
|--|---|---------------------|
| | Primärtumor | Leber- metastase |
| 13q12.13-q14.11 | | x |
| 13q14.3 | | x |
| 13q33.1-qtr | | (x) |
| 14q12-q22.1 | | |
| 14q23.1-32.33 | | |
| 15q13.3-q21.2 | | |
| 16p13.3-qtr | | (x) |
| 16q12.1-qtr | | (x) |
| 17p11.2-p13.3 | | |
| 17q11.1-qtr | | x |
| 18p11.22-p11.32 | | |
| 19p13.11-13.12 | | x |
| 19p13.2-p13.3 | | x |
| 20p11.21-p13 | x | x |
| 20q11.21-q13.33 | x | x |
| 21p11.2 | | |
| 21p11.1 | | |
| 21q22.3 | | |
| 22q11.1-q11.21 | | |
| 22q11.23-q12.3 | | |
| 22q13.3-qtr | | |
| Xp11.21-11.22 | | |
| Xp21.1-22.31 | (x) | x |
| Xq11.1-q23 | | |
| Xq24-q28 | | x |

| Zugewinne von CT26.WT (Fortsetzung) | Amplifikation in >15 % der KRK (Diep et al. 2006) | |
|---|---|---------------------|
| | Primärtumor | Leber- metastase |
| 13q14.3 | x | x |
| 13q33.1-qtr | x | x |
| 15q11.2-q21.2 | | |
| 15q26.1-26.3 | | |
| 16p13.11 | | x |
| 16p13.3 | | x |
| 16q11.2-qtr | | x |
| 18p11.22-p11.32 | | |
| 18q21.32-q22.1 | | |
| 19p13.11-p13.3 | | x |
| 19q12-q13.43 | | x |
| 20p11.1-p13 | x | x |
| 20q11.21-q13.33 | x | x |
| 21p11.2 | | |
| 21q11.1 | | |
| 21q22.3 | | |
| 22q11.23-12.1 | | |
| 22q12.3-q13.33 | | |
| Y1q11.23 | | |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Häufige chromosomale Imbalancen sowie Veränderungen ausgewählter Tumorsuppressorgene und Onkogene für die einzelnen Schritte der Tumorentstehung und -progression des KRK (verändert nach Diep et al. 2006 und Grade et al. 2006) | 11 |
| Abb. 2: Karyogramm einer männlichen Maus in der G-Bänderung..... | 12 |
| Abb. 3: Chromosomensatz der Maus, dargestellt in Idiogrammen der G-Bänderung (O'Brien et al. 2006)..... | 12 |
| Abb. 4: Prinzip der FISH | 16 |
| Abb. 5: mcb für alle 19 Autosomen und beide Gonosomen der Maus, | 17 |
| Abb. 6: Labeling-Schema für das am Institut für Humangenetik in Jena entwickelte mcb mit 5 Fluorochromen, mcb Y findet aktuell keine Verwendung (verändert nach Leibiger et al. 2013)..... | 25 |
| Abb. 7: Beispiel für ein mFISH-Karyogramm von CMT-93, Klon 1 | 29 |
| Abb. 8: Beispiel für ein mFISH-Karyogramm von CMT-93, Klon 2 | 30 |
| Abb. 9: CMT-93, mcb 2, Klon 1..... | 31 |
| Abb. 10: CMT-93, mcb 2, Klon 2 und Subklon 2b..... | 32 |
| Abb. 11: CMT-93, mcb 2, Subklon 2a | 32 |
| Abb. 12: CMT-93, mcb 5, Subklon 2a | 33 |
| Abb. 13: CMT-93, mcb 8, Klon 1..... | 34 |
| Abb. 14: CMT-93, mcb 8, Klon 2 mit seinen Subklonen..... | 35 |
| Abb. 15: CMT-93, mcb X, Subklon 2b..... | 37 |
| Abb. 16: Ergebnisse der array-CGH für das Mausgenom für CMT-93: Gain = Zugewinn (dunkelgrün = zweifache (Chromosom 2) bzw. dreifache Amplifikation (Chromosom 8)), Break = ausgewählte Bruchpunkte, Loss = Verlust | 41 |
| Abb. 17: Ergebnisse der in-silico-Translation in das Humangenom für CMT-93 (nicht berücksichtigt wurde das Y-Chromosom, Gain = Zugewinn, Loss = Verlust, Break = ausgewählte Bruchpunkte) | 41 |
| Abb. 18: Beispiel für ein mFISH-Karyogramm von CMT-93, Subklon 1a..... | 43 |
| Abb. 19: Beispiel für ein mFISH-Karyogramm von CMT-93, Subklon 2d | 44 |
| Abb. 20: CT26.WT, mcb 2 | 45 |
| Abb. 21: CT26.WT, mcb 3 | 46 |
| Abb. 22: CT26.WT, mcb 5, die Bruchpunkte von idic(5) sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet | 47 |

| | |
|--|----|
| Abb. 23: CT26.WT, mcb 6 | 48 |
| Abb. 24: CT26.WT, mcb 7 | 48 |
| Abb. 25: CT26.WT, mcb 9 | 49 |
| Abb. 26: CT26.WT, mcb 10 | 50 |
| Abb. 27: CT26.WT, mcb 13 | 51 |
| Abb. 28: CT26.WT, mcb 18, Subklone 1a und 2e | 52 |
| Abb. 29: CT26.WT, mcb 19 | 53 |
| Abb. 30: CT26.WT, mcb X, Klon 2 | 54 |
| Abb. 31: Ergebnisse der array-CGH für das Mausgenom für CT26.WT: Gain = Zugewinn (dunkelgrün = zweifache dreifache Amplifikation), Break = ausgewählte Bruchpunkte, Loss = Verlust | 58 |
| Abb. 32: Ergebnisse der in-silico-Translation in das Humangenom für CT26.WT (Gain = Zugewinn, Loss = Verlust, Break = ausgewählte Bruchpunkte) | 58 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Wichtige Signalwege beim KRK (Marmol et al. 2017)..... | 10 |
| Tab. 2: SkyPaint™ Farbcode mit 5 Fluorochromen zur Identifizierung aller Mauschromosomen | 22 |
| Tab. 3: Ergebnisse der array-CGH und der in-silico-Translation, getrennt nach Zugewinnen, Verlusten und Bruchpunkten. Einbezogen wurden auch nichtklonale Aberrationen aus mcb 15 und 17..... | 37 |
| Tab. 5: Ergebnisse der array-CGH und der in-silico-Translation, getrennt nach Zugewinnen, Verlusten und Bruchpunkten. Einbezogen wurden auch nichtklonale Aberrationen aus mcb 15 und 17..... | 54 |
| Tab. 5: Ermittelte Bruchpunkte und ihre Übereinstimmung mit den 50 häufigsten Bruchpunkten des KRK (Knutsen et al. 2010). * = Bruchpunkte in Zentromerbereichen des Mausgenoms, x = exakte Übereinstimmung, (x) = geringfügige Abweichung..... | 70 |
| Tab. 6: Amplifikationen des KRK und ihre Übereinstimmung in beiden Zelllinien. x = vollständige Überlappung, (x) = teilweise Überlappung..... | 71 |
| Tab. 7: Wichtige Tumorsuppressorgene des KRK und ihre Deletion oder Amplifikation im KRK sowie in beiden untersuchten Zelllinien | 72 |
| Tab. 8: mFISH-Ergebnisse für CMT-93 (Anmerkung: die Kopiezahlen der isodizentrischen Chromosomen sind bei den zugehörigen Einzelchromosomen zusätzlich berücksichtigt)..... | 79 |
| Tab. 9: mFISH-Ergebnisse für CT26.WT (Anmerkung: die Kopiezahlen der isodizentrischen Chromosomen sind bei den zugehörigen Einzelchromosomen zusätzlich berücksichtigt)..... | 80 |
| Tab. 10: Nichtklonale strukturelle Aberrationen in der mcb-Analyse von CMT-93..... | 81 |
| Tab. 11: Nichtklonale strukturelle Aberrationen in der mcb-Analyse von CT26.WT..... | 82 |
| Tab. 12: Zugewinne beider Zelllinien und ihre Übereinstimmung mit den häufigsten Amplifikationen im KRK..... | 83 |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben, herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn **PD Dr. Thomas Liehr** für die Überlassung des Themas sowie die anregenden Diskussionen und Ratschläge zu allen Aspekten der Arbeit;

Frau **Shaymaa S. Hussein Azawi** für die Einführung in die praktischen Arbeiten, die Bereitstellung der Zellsuspensionen und Sonden, den Vergleich der mcb- und array-CGH-Ergebnisse, die Translation sowie für ihr offenes Ohr und ihre Geduld bei allen Fragen und Problemen;

Frau **Monika Ziegler** und Frau **Katharina Kreskowski** für ihre Hilfe bei allen praktischen Fragen und Problemen sowie für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre;

Meinen Eltern für ihre Rücksicht und Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Thomas Liehr, Shaymaa S. Hussein Azawi, Martina Rincic, Monika Ziegler, Katharina Kreskowski

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Hans Rhode